

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003237

International filing date: 21 February 2005 (21.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-046238
Filing date: 23 February 2004 (23.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

21.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 2 月 2 3 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 4 6 2 3 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 4 6 2 3 8]

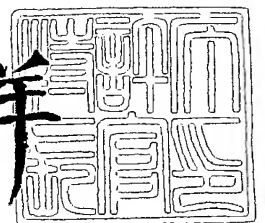
出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人科学技術振興機構
 横浜市

2 0 0 5 年 3 月 2 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川

洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 P04-002
【提出日】 平成16年 2月23日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C08H
C12N
G01N

【発明者】
【住所又は居所】 東京都三鷹市下連雀 2 - 2 0 - 6
【氏名】 西村 善文

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県川口市安行領家 1 0 2 - 3
【氏名】 花岡 慎悟

【特許出願人】
【識別番号】 503360115
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構

【特許出願人】
【識別番号】 398047227
【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区港町 1 - 1
【氏名又は名称】 横浜市

【代理人】
【識別番号】 100098121
【弁理士】
【氏名又は名称】 間山 世津子

【選任した代理人】
【識別番号】 100107870
【弁理士】
【氏名又は名称】 野村 健一

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 093194
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の(a)又は(b)の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換、34位のアラニンからセリンへの置換、47位のアラニンからセリンへの置換及び59位のアルギニンからリシンへの置換からなる群より選択される少なくとも1つの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、10位のアミノ酸、34位のアミノ酸、47位のアミノ酸及び59位のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせんDNAへの結合能が配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型 T R F 2 D N A 結合ドメインよりも高いタンパク質

【請求項 2】

(a) のタンパク質が以下の (ia) ~ (via) のいずれかのタンパク質である請求項 1 記載の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩。

(ia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(iia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、34位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(iiaa) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、47位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(iva) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、59位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(va) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換、34位のアラニンからセリンへの置換、47位のアラニンからセリンへの置換及び59位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(via) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換及び47位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

【請求項 3】

請求項 1 記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 4】

請求項 3 記載の DNA を含有する組換えベクター。

【請求項 5】

請求項 4 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 6】

請求項 3 記載の DNA で形質転換した宿主を培養し、培養物から T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質を採取することを含む T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質の製造方法。

【請求項 7】

請求項 1 記載の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩に対する抗体。

【請求項 8】

請求項 1 記載の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質又はその塩。

【請求項 9】

請求項 1 又は 8 記載のタンパク質と DNA との複合体。

【請求項 10】

配列番号 17 の塩基配列において、3番目の T から G への置換、7番目の G から C への置換及び9番目の T から G への置換からなる群より選択される少なくとも1つの置換がなされている塩基配列を有する DNA。

【請求項 11】

以下の(ib)~(iiib)のいずれかのDNAである請求項10記載のDNA。

(ib) 配列番号17の塩基配列において、3番目のTからGへの置換がなされている塩基配列を有するDNA

(iib) 配列番号17の塩基配列において、7番目のGからCへの置換がなされている塩基配列を有するDNA

(iiib) 配列番号17の塩基配列において、9番目のTからGへの置換がなされている塩基配列を有するDNA

【請求項12】

配列番号2のアミノ酸配列を有するTRF2 DNA結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10位のリシン、34位のアラニン、47位のアラニン及び59位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析し、相互作用する場合には、被験物質がテロメアDNAとTRF2との結合を制御することができることと判定することを含む、テロメアDNAとTRF2との結合を制御することができる物質をスクリーニングする方法。

【請求項13】

5'-TTAGGG-3'で表される配列を含む二重らせんDNAの存在下で、配列番号2のアミノ酸配列を有するTRF2 DNA結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10位のリシン、34位のアラニン、47位のアラニン及び59位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析する請求項12記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】テロメアタンパク質TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質、テロメアDNA変異体及びTRF2 DNA結合ドメインと二重らせんDNAとの複合体構造の利用

【技術分野】

【0001】

本発明は、テロメアタンパク質TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質、テロメアDNA変異体及びTRF2 DNA結合ドメインと二重らせんDNAとの複合体構造の利用に関する。

【背景技術】

【0002】

脊椎動物の染色体末端はテロメアと呼ばれGG配列に富んだ繰り返しDNAとタンパク質から構成されている。哺乳類のテロメア末端はテロメアDNA結合タンパク質TRF1及びTRF2とそれらと相互作用するタンパク質などで構成されており、2本鎖DNA損傷末端の監視機構からの認識を免れている（非特許文献1～3）。最近、テロメアタンパク質TRF2が機能的テロメア構造を形成するうえで、重要な役割を担っていることを裏付ける報告が数多く提示されてきた。TRF2は全長500個のアミノ酸からなり、N末には420残基からなる2量体形成ドメイン、C末には60残基からなるDNA結合ドメインが存在する。相同性の高いテロメアDNA結合タンパク質TRF1は439アミノ酸からなり同様にN末側に2量体形成ドメイン、C末にDNA結合ドメインが存在し、各ドメインの相同性は非常に高いが、2量体形成ドメインの前の約50アミノ酸がTRF2では塩基性アミノ酸に富んでいるのに対し、TRF1では酸性アミノ酸に富んでいる（非特許文献2～5）。このTRF1、TRF2のDNA結合ドメインは同じDNA配列(TTAGGGのタンデムなりリピート配列)を認識する。しかし、in vitroでTRF1は2本鎖DNA配列を認識し、DNAを折り曲げるのに対し（非特許文献4、6及び7）、TRF2は2本鎖DNAと3'突出末端の接合部位に優先的に結合しt-loop構造をとらせる（非特許文献8）。t-loopとは3'突出末端が内側の2本鎖部分のテロメア配列に入り込んで、その反対側のテロメア配列と2本鎖を形成することによって、作られるループ構造でありt-loop内ではその接合部位にTRF2が結合している（非特許文献9）。このTRF2のテロメアDNAへの結合を阻害するだけで、染色体の不安定性ならびにp16/RB系を介した老化やATM/p53系を介したアポトーシスによる細胞死を誘導する（非特許文献10～13）。つまりTRF1とTRF2へのDNA結合様式には大きな違いがあり、テロメア結合分子は単にテロメア配列に結合するのではなく、テロメア末端の3次元的な構造変化を引き起こすことによって機能的なテロメア構造を形成しているのではないかと考えられている（非特許文献9）。DNA結合タンパク質であるTRF1とTRF2のDNA結合ドメインの相同性は約60%と高く、同じ配列を認識している。その配列は癌原遺伝子産物c-Myb（非特許文献14、15）のDNA結合ドメインの3つの各リピート配列との相同性が高いことが知られている。C-MybのDNA結合ドメインはR1、R2、R3と呼ばれる53残基からなるリピート配列から成っており、各リピートは3本ヘリックスから形成されている。TRF1のDNA結合ドメインは以前報告され、c-Myb同様3つのヘリックスから成っており3番目のヘリックスがDNAの主溝に深く入ることでDNAに結合する（非特許文献16）。TRF2のDNA結合ドメインの配列はTRF1でのDNAの認識に関わるアミノ酸はほとんど保存されており、TRF1同様のDNAへの結合様式を取ると考えられる。このTRF2とDNAとの複合体の構造やその性質を調べ、TRF1との違いを調べることはテロメアの染色体末端の保護機構を調べる上で大変に重要である。

【非特許文献1】Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C.E., Laroche, T. & Gilson, E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. Nat. Genet. 17, 236-239. (1997)

【非特許文献2】Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. & de Lange, T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. Nat. Genet. 17, 231-235. (1997)

【非特許文献3】Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage

, H., Hanish, J., Tempst, P. & de Lange, T. A human telomeric protein. *Science* 270, 1663-1667. (1995)

【非特許文献 4】 Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P. & de Lange, T. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J.* 16, 1785-1794. (1997)

【非特許文献 5】 Smith, S. & de Lange, T. TRF1, a mammalian telomeric protein. *Trends Genet.* 13, 21-26. (1997)

【非特許文献 6】 Bianchi, A.M., Stansel, R.M., Fairall, L.D., Griffith, J.D., Rhodes, D. & de Lange, T. TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *EMBO J.* 18, 5735-5744. (1999)

【非特許文献 7】 Griffith, J., Bianchi, A. & de Lange, T. TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J. Mol. Biol.* 278, 79-88. (1998)

【非特許文献 8】 Stansel, R.M., de Lange, T. & Griffith, J.D. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J.* 20, E5532-E5540. (2001)

【非特許文献 9】 Griffith, J.D., Comenau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H. & de Lange, T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514. (1999)

【非特許文献 10】 Karlseder, J., Smogorzewska, A. & de Lange, T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295, 2446-2449. (2002)

【非特許文献 11】 van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusion. *Cell* 92, 401-413. (1998)

【非特許文献 12】 Smogorzewska, A. & de Lange, T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* 21, 4338-4348. (2002)

【非特許文献 13】 Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange, T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325. (1999)

【非特許文献 14】 Gonda, T.J., Gough, N.M., Dunn, A.R. & de Blaquiere, J. Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb proto-oncogene. *EMBO J.* 4, 2003-2008. (1985)

【非特許文献 15】 Klempnauer, K.H. & Sippel, A.E. The highly conserved amino-terminal region of the protein encoded by the v-myb oncogene functions as a DNA-binding domain. *EMBO J.* 6, 2719-2725. (1987)

【非特許文献 16】 Nishikawa, T., Okamura, H., Nagadoi, A., Konig, P., Rhodes, D. & Nishimura, Y. Solution structure of a telomere DNA complex of human TRF1. *Structure* 9, 1237-1251. (2001)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、テロメアタンパク質 TRF2 DNA 結合ドメインとテロメア二重らせん DNA との複合体構造とその機能を解析することを目的とする。

【0004】

また、本発明は、これらの解析結果により、TRF2 の DNA への結合能を調節できる薬剤のスクリーニングを可能とし、TRF2 をターゲットにした創薬に貢献することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、テロメアタンパク質 TRF2 DNA 結合ドメインとテロメア二重らせん DNA との複合体構造を NMR 法で決定した。以前に報告されているテロメアタンパク質 TRF1 とテロメア二重らせん DNA との複合体の構造 (Nishikawa, T., Okamura, H., Na

gadoi, A., Konig, P., Rhodes, D. & Nishimura, Y. Solution structure of a telomeric DNA complex of human TRF1. Structure 9, 1237-1251. (2001)) と比較して、TRF2 と TRF1 の二重鎖DNA に対する認識様式を比較した。TRF1 と TRF2 のアミノ酸は約40%(TRF1とTRF2の相同性はidentityで約60%ある。)異なっているが、構造比較の結果、TRF2 の4個のアミノ酸のみをTRF1型に置換することによって、TRF2 のDNA結合能をTRF1型に変換することに成功した。すなわち、TRF2 のテロメア二重らせんDNA結合能が野生型より非常に強い変異体を作製することができた。本発明は、これらの知見に基づいて完成されたものである。

【0006】

本発明の要旨は以下の通りである。

- (1) 以下の(a)又は(b)のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩。
(a)配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換、34位のアラニンからセリンへの置換、47位のアラニンからセリンへの置換及び59位のアルギニンからリシンへの置換からなる群より選択される少なくとも1つの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質
(b)(a)のタンパク質のアミノ酸配列において、10位のアミノ酸、34位のアミノ酸、47位のアミノ酸及び59位のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ5'-TTAGGG-3'で表される配列を含む二重らせんDNAへの結合能が配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型TRF2 DNA結合ドメインよりも高いタンパク質
- (2) (a)のタンパク質が以下の(ia)~(via)のいずれかのタンパク質である(1)記載のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩。
(ia)配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質
(iia)配列番号2のアミノ酸配列において、34位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質
(iiaa)配列番号2のアミノ酸配列において、47位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質
(iva)配列番号2のアミノ酸配列において、59位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質
(va)配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換、34位のアラニンからセリンへの置換、47位のアラニンからセリンへの置換及び59位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質
(via)配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換及び47位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質
- (3) (1)記載のタンパク質をコードするDNA。
- (4) (3)記載のDNAを含有する組換えベクター。
- (5) (4)記載の組換えベクターを含む形質転換体。
- (6) (3)記載のDNAで形質転換した宿主を培養し、培養物からTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を採取することを含むTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質の製造方法。
- (7) (1)記載のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩に対する抗体。
- (8) (1)記載のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質又はその塩。
- (9) (1)又は(8)記載のタンパク質とDNAとの複合体。
- (10) 配列番号17の塩基配列において、3番目のTからGへの置換、7番目のGからCへの置換及び9番目のTからGへの置換からなる群より選択される少なくとも1つの置換がなされている塩基配列を有するDNA。
- (11) 以下の(ib)~(iiib)のいずれかのDNAである(10)記載のDNA。

(ib) 配列番号 17 の塩基配列において、3番目のTからGへの置換がなされている塩基配列を有するDNA

(iib) 配列番号 17 の塩基配列において、7番目のGからCへの置換がなされている塩基配列を有するDNA

(iiib) 配列番号 17 の塩基配列において、9番目のTからGへの置換がなされている塩基配列を有するDNA

(12) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する TRF2 DNA結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10位のリシン、34位のアラニン、47位のアラニン及び59位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析し、相互作用する場合には、被験物質がテロメアDNAとTRF2との結合を制御することができると判定することを含む、テロメアDNAとTRF2との結合を制御することができる物質をスクリーニングする方法。

(13) 5'-TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせんDNAの存在下で、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する TRF2 DNA結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10位のリシン、34位のアラニン、47位のアラニン及び59位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析する(12)記載の方法。

【0007】

本明細書において、「TRF2」とは、哺乳類のテロメア' TTAGGG' 繰り返し配列に特異的に結合する500アミノ酸からなるタンパク質であり、N末端に塩基性領域、中央部に2量体形成ドメイン、C末端にDNA結合ドメインから構成されているものをいう。

【0008】

「TRF2 DNA結合ドメイン」とは、TRF2のC末端部位にある約60アミノ酸からなる領域をいう。その領域のみでDNAへの結合が可能である。

【0009】

「変異体タンパク質」とは、基準となるタンパク質と異なるが、基準となるタンパク質の不可欠な性質を保持しているタンパク質を意味する。典型的な変異体タンパク質は、基準となるタンパク質とアミノ酸配列が相違する。

【0010】

5'-TTAGGG-3' は、哺乳類のテロメアDNAの二重鎖DNAの繰り返し配列であり、ここに特異的なタンパク質(例えば、出芽酵母のRap1、分裂酵母のTaz1p、コメのRTBP1、哺乳類で見つかったTRF1およびTRF2)が結合する。5'-TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせんDNAとしては、以下の配列を有するDNAを例示することができる。

tr13: 5'-GTTAGGGTTAGGG-3' (配列番号17) / 5'-CCCATTCCTTC-3' (配列番号18)

【0011】

TRF2 DNA結合ドメイン又はその変異体タンパク質の5'-TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせんDNAへの結合能は、後述の実施例に示すような表面プラズマ共鳴により測定することができる。

【0012】

「テロメアDNA」とは、脊椎動物の染色体末端のDNAはGに富んだ繰り返し配列とそのDNAに結合するタンパク質で構成されているテロメアと呼ばれる領域があるが、この繰り返しDNA配列がテロメアDNAである。

【0013】

「抗体」とは、抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に誘導されるタンパク質で、免疫原(抗原)と特異的に結合する活性を有するものを意味し、これには、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらには、Fab又はFabフラグメントなどが含まれる。

【0014】

「相互作用」とは、2つ以上の物体（例えば、原子、分子）の間に力が働きあうことをいう。相互作用としては、親水性の相互作用（例えば、水素結合、塩橋）、疎水性の相互作用（例えば、疎水結合）、静電相互作用、ファンデルワールス相互作用などを例示することができる。

【発明の効果】

【0015】

本発明により、TRF2のテロメア二重らせんDNA結合能が野生型より非常に強い変異体が提供された。

【0016】

また、本発明により、テロメアタンパク質TRF2 DNA結合ドメインとテロメア二重らせんDNAとの複合体構造とその機能が解析され、TRF2のDNAへの結合能を調節できる薬剤のスクリーニングが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

1. TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質

本発明は、以下の(a)又は(b)のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩を提供する。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換、34位のアラニンからセリンへの置換、47位のアラニンからセリンへの置換及び59位のアルギニンからリシンへの置換からなる群より選択される少なくとも1つの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) (a)のタンパク質のアミノ酸配列において、10位のアミノ酸、34位のアミノ酸、47位のアミノ酸及び59位のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ5'-TTAGGG-3'で表される配列を含む二重らせんDNAへの結合能が配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型TRF2 DNA結合ドメインよりも高いタンパク質

(a)のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質としては、以下の(ia)～(via)のタンパク質を例示することができる。

(ia) 配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(iia) 配列番号2のアミノ酸配列において、34位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(iia) 配列番号2のアミノ酸配列において、47位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(iva) 配列番号2のアミノ酸配列において、59位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(va) 配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換、34位のアラニンからセリンへの置換、47位のアラニンからセリンへの置換及び59位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(via) 配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換及び47位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

【0018】

(ia)のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0019】

(iia)のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号6に示す。

【0020】

(iia)のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号8に示す。

【0021】

(iva)のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号10に示す。

【0022】

(va) のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号12に示す。

【0023】

(via) のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号14に示す。

【0024】

(b)のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質としては、ヒト以外の生物（例えば、酵母、コメ、脊椎動物など）に由来する野生型TRF2 DNA結合ドメインの変異体、配列番号4、6、8、10、12及び14のアミノ酸配列のN末端（すなわち、1位）にメチオニンが付加したアミノ酸配列を有するタンパク質などを例示することができる。

【0025】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質は、ヒト由来の野生型TRF2 DNA結合ドメインの変異体であっても、ヒト以外の生物（例えば、酵母、コメ、脊椎動物など）由来の野生型TRF2 DNA結合ドメインの変異体であってもよい。

【0026】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩は、公知の方法によって製造することができる。例えば、後述の2に記載のようにして、TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAを得、得られたDNAを適当な発現ベクターに組み込んだ後、適当な宿主に導入し、組換え蛋白質として生産させることにより、TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を製造することができる（例えば、西郷薫、佐野弓子共訳、CURRENT PROTOCOLSコンパクト版、分子生物学実験プロトコル、I、II、III、丸善株式会社：原著、Ausubel, F. M. 等, Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照のこと）。

【0027】

あるいはまた、本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩は、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

【0028】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質は公知の方法により塩の形で得ることもできる。

【0029】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質の塩は、薬理学的に許容される塩であるとして、特に、薬理学的に許容される酸付加塩が好ましい。薬理学的に許容される酸付加塩としては、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などを例示することができる。

【0030】

2. TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNA

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAは、本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号3、5、7、9、11又は13のいずれかの塩基配列を有するDNAを例示することができる。

【0031】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAは、例えば、以下のようにして製造することができる。

【0032】

健常なヒトのHela細胞からmRNAを抽出し、逆転写酵素およびオリゴdTプライマーを用いてcDNAを合成する。TRF2 DNA結合ドメインを含む領域（63残基）をPCRによって増

幅する。得られたPCR産物が野生型hTRF2のDNA結合ドメインを含む領域をコードするDNAである。野生型hTRF2のDNA結合ドメインを含む領域のアミノ酸配列及びそれをコードするDNAの塩基配列の一例をそれぞれ配列番号2及び1に示す。

【0033】

hTRF2のDNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAは、hTRF2のDNA結合ドメインのコード領域(63残基)を点突然変異誘発法により変異させることにより作製することができる。変異させたhTRF2のDNA結合ドメインのコード領域(63残基)をPCRによって増幅する。得られたPCR産物がhTRF2のDNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAである。配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAの塩基配列の一例を配列番号3に示す。配列番号2のアミノ酸配列において、34位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAの塩基配列の一例を配列番号5に示す。配列番号2のアミノ酸配列において、47位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAの塩基配列の一例を配列番号7に示す。配列番号2のアミノ酸配列において、59位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAの塩基配列の一例を配列番号9に示す。配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換、34位のアラニンからセリンへの置換、47位のアラニンからセリンへの置換及び59位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAの塩基配列の一例を配列番号11に示す。配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換及び47位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAの塩基配列の一例を配列番号13に示す。

【0034】

3. 組換えベクター

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAを含有する組換えベクターは、公知の方法(例えば、Molecular Cloning 2nd Edition, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法)により、本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入することにより得られる。

【0035】

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫病原ウイルスなどを用いることができる。

【0036】

発現ベクターには、プロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジンなどを付加してもよい。

【0037】

また、発現ベクターは、融合タンパク質発現ベクターであってもよい。種々の融合タンパク質発現ベクターが市販されており、pGEXシリーズ(アマシャムファルマシアバイオテク社)、pET CBD Fusion System 34b-38b (Novagen社)、pET Dsb Fusion Systems 39b and 40b (Novagen社)、pET GST Fusion System 41 and 42 (Novagen社)などを例示することができる。

【0038】

4. 形質転換体

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAを含有する組換えベクターを宿主に導入することにより、形質転換体を得ることができる。

【0039】

宿主としては、細菌細胞（例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、枯草菌など）、真菌細胞（例えば、酵母、アスペルギルスなど）、昆虫細胞（例えば、S2細胞、Sf細胞など）、動物細胞（例えば、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、HEK293細胞など）、植物細胞などを例示することができる。

【0040】

組換えベクターを宿主に導入するには、Molecular Cloning 2nd Edition, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法（例えば、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、トランスベクション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、エレクロトポレーション法、形質導入法、スクレエプローディング法、ショットガン法など）または感染により行うことができる。

【0041】

形質転換体を培地で培養し、培養物からTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を採取することができる。TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質が培地に分泌される場合には、培地を回収し、その培地からTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を分離し、精製すればよい。TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質が形質転換された細胞内に産生される場合には、その細胞を溶解し、その溶解物からTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を分離し、精製すればよい。

【0042】

TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質が別のタンパク質（タグとして機能する）との融合タンパク質の形態で発現される場合には、融合タンパク質を分離及び精製した後に、FactorXaや酵素（エンテロキナーゼ）処理をすることにより、別のタンパク質を切断し、目的とするTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を得ることができる。

【0043】

TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質の分離及び精製は、公知の方法により行うことができる。公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0044】

5. 抗体

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩に対する抗体は、本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩の検出及び/又は定量に利用することができる。

【0045】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩に対する抗体は、慣用のプロトコルを用いて、本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩またはそのエピトープを含む断片を動物に投与することにより得られる。

【0046】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体のいずれであってもよい。

【0047】

ポリクローナル抗体を作製するには、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、動物に投与（免疫）を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、免疫動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することが

できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、免疫グロブリンの分離精製法（例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従って行なうことができる。

【0048】

モノクローナル抗体は、Nature (1975) 256: 495、Science (1980) 208: 692-に記載されている、G. Koehler及びC. Milsteinのハイブリドーマ法により作製することができる。すなわち、動物を免疫した後、免疫動物の脾臓から抗体産生細胞を単離し、これを骨髓腫細胞と融合させることによりモノクローナル抗体産生細胞を調製する。さらに、インターロイキン-18変異体タンパク質又はその塩と特異的に反応するが、他の抗原タンパク質とは実質的に交差反応しない抗体を産生する細胞系を単離するとよい。この細胞系を培養し、培養物から所望のモノクローナル抗体を取得することができる。モノクローナル抗体の精製は、上記の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0049】

一本鎖抗体を作製する技法は、米国特許第4,946,778号に記載されている。

【0050】

ヒト化抗体を作製する技法は、Biotechnology 10, 1121-, 1992; Biotechnology 10, 169-, 1992に記載されている。

【0051】

6. TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩の用途

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩は、TRF2が関与する事象（例えば、癌、老化、アポトーシスなど）の制御に利用することができる。TRF2のDNAへの結合能をなくすと、老化やアポトーシスが起こることがわかっているKalseder, J., Smogorzewska, A. & de Lange, T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. Science 295, 2446-2449. (2002); Smogorzewska, A. & de Lange, T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells, EMBO J. 21, 4338-4348. (2002); Kalseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange, T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. Science 283, 1321-1325. (1999))ので、本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩を利用して、老化やアポトーシスを防止できると考えられる。

【0052】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩を被験体に投与する場合には、TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩を、単独で、あるいは、薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とともに、適当な剤型の医薬組成物として、哺乳動物（例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与は、疾病の状態の重篤度や生体の応答性によるが、治療の有効性が認められるまで、あるいは疾病状態の軽減が達成されるまでの期間にわたり、適当な用量、投与方法、頻度で行えばよい。

【0053】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩は、疾患の予防及び／又は治療を目的とする医薬品として、あるいは、実験用の試薬として利用することができる。

【0054】

7. TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質

また、本発明は、上記のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩を提供する。TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質としては、野生型TRF2において、DNA結合ドメイン領域が本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質に置換されたものを例示することができる。野生型ヒトTRF2の塩基配列及びアミノ酸配列をそれぞれ配列番号15及び16に示す。配列番号

16のアミノ酸配列において、1位から45位までがN末の塩基性ドメイン、46位から245位までが中央のTRF特異的／二量化ドメイン、438位から500位までがDNA結合ドメインである。配列番号2のアミノ酸配列は、配列番号16のアミノ酸配列における438位のグルタミン酸から500位のアスパラギンまでの断片である。配列番号2のアミノ酸配列における10, 34, 47及び59位のアミノ酸部位は、それぞれ、配列番号16のアミノ酸配列における447, 471, 484及び496位のアミノ酸部位に相当する。

【0055】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩は、公知の方法によって製造することができる。例えば、TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質をコードするDNAを得、得られたDNAを適当な発現ベクターに組み込んだ後、適当な宿主に導入し、組換え蛋白質として生産させることにより、TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質を製造することができる（例えば、西郷薫、佐野弓子共訳、CURRENT PROTOCOLSコンパクト版、分子生物学実験プロトコル、I、II、III、丸善株式会社：原著、Ausubel, F. M. 等, Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照のこと）。

【0056】

あるいはまた、本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩は、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

【0057】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質は公知の方法により塩の形で得ることもできる。

【0058】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質の塩は、薬理的に許容される塩であるとよく、特に、薬理的に許容される酸付加塩が好ましい。薬理的に許容される酸付加塩としては、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などを例示することができる。

【0059】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩は、TRF2が関与する事象（例えば、癌、老化、アポトーシスなど）の制御に利用することができる。TRF2のDNAへの結合能をなくすと、老化やアポトーシスが起こることがわかっているKarsan, J., Smogorzewska, A. & de Lange, T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. Science 295, 2446-2449. (2002); Smogorzewska, A. & de Lange, T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells, EMBO J. 21, 4338-4348. (2002); Karsan, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange, T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. Science 283, 1321-1325. (1999))ので、本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩を利用して、老化やアポトーシスを防止できると考えられる。

【0060】

タンパク質の投与法は上記の通りである。

【0061】

本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩は、疾患の予防及び／又は治療を目的とする医薬品として、あるいは、実験用の試薬として利用することができる。

【0062】

8. テロメアDNA変異体

本発明は、配列番号 17 の塩基配列において、3 番目の T から G への置換、7 番目の G から C への置換及び 9 番目の T から G への置換からなる群より選択される少なくとも 1 つの置換がなされている塩基配列を有する DNA（以下、「テロメア DNA 変異体」と記すこともある。）を提供する。

【0063】

本発明のテロメア DNA 変異体としては、以下の (ib) ~ (iib) の DNA を例示することができる。

(ib) 配列番号 17 の塩基配列において、3 番目の T から G への置換がなされている塩基配列を有する DNA。

(iib) 配列番号 17 の塩基配列において、7 番目の G から C への置換がなされている塩基配列を有する DNA。

(iib) 配列番号 17 の塩基配列において、9 番目の T から G への置換がなされている塩基配列を有する DNA。

【0064】

(ib) の DNA の塩基配列を配列番号 19 に示す。

【0065】

(iib) の DNA の塩基配列を配列番号 20 に示す。

【0066】

(iib) の DNA の塩基配列を配列番号 21 に示す。

【0067】

本発明のテロメア DNA 変異体は、一本鎖であっても、二本鎖であっても、一部が一本鎖で残りの部分が二本鎖であるものであってもよいが、テロメア DNA の二重鎖 DNA の繰り返し配列に特異的なタンパク質（すなわち、テロメアタンパク質）との結合性の点からは、二本鎖であることが好ましい。

【0068】

本発明のテロメア DNA 変異体は公知の方法で合成することができる。例えば、市販の DNA 合成機を用いて合成することができる。

【0069】

本発明のテロメア DNA 変異体は、後述の実施例に示すように、テロメアタンパク質（例えば、TRF1、TRF2 など）の機能解析に利用することができる。また、本発明のテロメア DNA 変異体は、テロメアタンパク質（例えば、TRF1、TRF2 など）が関与する事象（例えば、癌、老化、アポトーシスなど）の制御に利用できると考えられる。

【0070】

本発明のテロメア DNA 変異体は、疾患の予防及び／又は治療を目的とする医薬品として、あるいは、実験用の試薬として利用することができる。

【0071】

9. TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質又は該変異体タンパク質を含むタンパク質と DNA との複合体

本発明は、上記の TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質又は該変異体タンパク質を含むタンパク質と DNA との複合体を提供する。

【0072】

本発明の複合体を形成するタンパク質は、以下の (a) 若しくは (b) の TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質又は該変異体タンパク質を含むタンパク質である。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換、47 位のアラニンからセリンへの置換及び 59 位のアルギニンからリシンへの置換からなる群より選択される少なくとも 1 つの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、10 位のアミノ酸、34 位のアミノ酸、47 位のアミノ酸及び 59 位のアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ 5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせん DNA

への結合能が配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型TRF2 DNA結合ドメインよりも高いタンパク質。

【0073】

(a)のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質としては、配列番号4、6、8、10、12及び14のアミノ酸配列を有するタンパク質を例示することができる。

【0074】

(a)のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質としては、野生型TRF2において、DNA結合ドメイン領域が配列番号4、6、8、10、12又は14のアミノ酸配列を有するタンパク質に置換されたものを例示することができる。野生型ヒトTRF2のアミノ酸配列を配列番号16に示す。配列番号16のアミノ酸配列において、Glu438からAsn500までがDNA結合ドメイン領域である。

【0075】

本発明の複合体を形成するDNAとしては、5'-TTAGGG-3'で表される配列を含む二重らせんDNAを挙げることができる。5'-TTAGGG-3'で表される配列を含む二重らせんDNAとしては、以下の配列を有するDNAを例示することができる。
tr13: 5'-GTTAGGGTTAGGG-3' (配列番号17) / 5'-CCCATTCCCATT-3' (配列番号18)

【0076】

本発明の複合体を形成するには以下のようにするとよい。
DNA及びタンパク質は50mM以上の塩濃度、pH6.0~8.0の溶液中で30℃以下の温度で混合する。混合においてDNAに対しタンパク質を加えるようにし、タンパク質のモル比がDNAのモル比を超えないようにする。また、塩濃度を落としたときは上記の条件で複合体を形成させたのち透析で溶液の交換をする。

【0077】

複合体の形成はBiacore(Biomolecular Interaction Analysis Core technology)装置(Biacore社)により確認することができる。例えば、本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又は該変異体タンパク質を含むタンパク質をセンサーチップ上に固定した後に、このセンサーチップ上で、DNAと接触させるとよい。あるいは、DNAをセンサーチップ上に固定した後に、このセンサーチップ上で、本発明のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又は該変異体タンパク質を含むタンパク質と接触させてもよい。2分子間の結合、解離に伴うセンサーチップ表面での微量な質量変化をSPR(Surface Plasmon Resonance)シグナルとして検出し、このシグナルの経時変化をSensorgramと呼ぶグラフとして表示させ、これを解析ソフトで解析することにより、 K_D 値を求めることができる。 K_D 値が、 10^{-4} 以下、好ましくは 10^{-5} 以下、より好ましくは 10^{-6} 以下であれば、タンパク質とDNAが特異的な結合をしている、すなわち、複合体を形成していると言える。

【0078】

10. スクリーニング方法

本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を有するTRF2 DNA結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10位のリシン、34位のアラニン、47位のアラニン及び59位のア르기ニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析し、相互作用する場合には、被験物質がテロメアDNAとTRF2との結合を制御することができることを含む、テロメアDNAとTRF2との結合を制御することができる物質をスクリーニングする方法を提供する。本発明の方法において、5'-TTAGGG-3'で表される配列を含む二重らせんDNAの存在下で、配列番号2のアミノ酸配列を有するTRF2 DNA結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10位のリシン、34位のアラニン、47位のアラニン及び59位のア르기ニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析してもよい。5'-TTAGGG-3'で表される配列を含む二重らせんDNAとしては、以下の配列を有するDNAを例示することができる。

tr13: 5' -GTTAGGGTTAGGG-3' (配列番号17) / 5' -CCCATTCCCATT-3' (配列番号18)

【0079】

配列番号2のアミノ酸配列を有するTRF2 DNA結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10位のリシン、34位のアラニン、47位のアラニン及び59位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析するには、X線結晶構造解析、核磁気共鳴(NMR)、中性子回折などの立体構造解析、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡などの複合体の形状を観察する方法やm配列番号2のアミノ酸配列を有するTRF2 DNA結合ドメインの立体構造に対する任意の構造の被験物質との安定な結合様式をコンピュータでシミュレートするドッキングスタディなどの手法、本発明者らがこの明細書において開示するヒトTRF2の立体構造との類似性に基づく判断を用いることができる。

【0080】

テロメアDNAとTRF2の結合を制御することができる物質は、細胞の老化を進めたりあるいは逆に遅らせたりする活性、細胞のがん化を遅らせる活性、がん細胞の細胞死を進めるような生理活性を持ちうる。従って、本発明のスクリーニング方法により、テロメアDNAとTRF2との結合を制御できると判定された物質は、抗がん剤、細胞老化抑制剤、細胞老化促進剤等に利用することができる。

【実施例】

【0081】

以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0082】

『結果及び考察』

構造計算

hTRF2のDNA結合ドメインを含む領域(hTRF2DBD: N末端にMetが付加したGlu438からAsn500)とDNAとの複合体の構造をNMRを用いて決定した。目的タンパク質hTRF2DBDは大腸菌大量発現系により¹⁵Nまたは¹⁵N/¹³Cラベルしたサンプルを作成した。また、複合体に用いたDNAは以前報告されているhTRF1とDNAとの複合体の構造決定に用いられた配列tr13: 5' -GTTAGGGTTAGGG-3'を用いた。フリーと複合体の構造ではそれぞれ910と1412のNOEsを強度により4つの範囲(1.8-3.0、2.3-4.0、2.3-5.0、2.3-6.0)にそれぞれ分けた。角度制限は³JHN $\alpha < 5.5\text{Hz}$ に対して $-90^\circ < \phi < -40^\circ$ 、³JHN $\alpha > 8.5\text{Hz}$ に対して $-160^\circ < \phi < -80^\circ$ にした。フリーの構造は距離制限が0.3 オングストローム以下、角度制限が 5° 以下を満たした。構造的に矛盾のない構造からもっともエネルギーの低い25個の構造を選んだ。また、複合体の計算ではDNAの制限としてWatson - Crickの塩基間の水素結合の制限がGC塩基間で $rg(N1)-C(N3) = 2.95 \pm 0.2$ オングストローム、 $rg(N2)-C(O2) = 2.86 \pm 0.2$ オングストローム、 $rg(O6)-C(N4) = 2.91 \pm 0.2$ オングストローム及びTA塩基間で $ra(N6)-T(O4) = 2.95 \pm 0.2$ オングストローム、and $ra(N1)-T(N3) = 2.82 \pm 0.2$ オングストロームにし、角度制限としてA型及びB型のDNAを満たす範囲で $\alpha = -65 \pm 50^\circ$ 、 $\beta = 180 \pm 50^\circ$ 、 $\gamma = 60 \pm 50^\circ$ 、 $\epsilon = 180 \pm 50^\circ$ 、 $\zeta = -85 \pm 50^\circ$ にした。以上の条件を用いてCNS(crystallography and NMR system; Yale University)で構造計算を行なった。複合体の計算では最初にhTRF2DBDだけのNOEを用いて計算を行い、条件を満たす200個の構造を決定した。次に200個の構造に対し、典型的なB型DNAをタンパクから50 オングストロームの距離に異なった方向に置き、全ての制限を用いて計算を行った。最後に距離制限が0.3 オングストローム以下、角度制限が 5° 以下を満たし、構造的に矛盾のない構造を20個選んだ。

【0083】

hTRF2のDNA結合ドメインの構造

決定されたhTRF2のDNA結合ドメインを含むN末端にMetが付加したGlu438からAsn500まで(hTRF2DBD)の25個の構造をFig2(a)に示した。hTRF2DBDの平均座標に対する個々のrmsdはbackboneで 0.34 ± 0.05 オングストローム、All heavy atomsで 0.82 ± 0.06 オングストローム、だった。hTRF1の構造とはヘリックス間のループに若干の違いが見られるだけで基本構造はほとんど同じであり、Trp450、Val458、Leu462、Trp470、Leu474、Phe479、Ile487、Trp491、Met494が主な分子内に疎水性のコアをつくりタンパク質の構造を安定化していた。また、疎水性のコアのほかにGlu453とArg482、Ser454とArg490が架橋をつくり構造の安定化に寄与している。この構造は今まで知られている典型的なMyb構造である。

【0084】

hTRF2DBDとDNAの複合体の構造

複合体の構造解析に用いたDNAは以前報告されたhTRF1とDNAとの複合体の構造に使用されたtr13: 5' - GTTAGGGTTAGGG - 3' / 5' - CCCATTCATTC - 3' を使用した。まず、hTRF1同様tr13にhTRF2が結合できるか確認するためNMRによる滴定実験を行なった。DNAに対してタンパクを加えていったところhTRF1同様1:1でhTRF2DBDが結合することがわかった。そこでDNAとタンパクの比を1:1になるように試料を調整しNMRにより、20個の複合体の構造を決定した(Fig2(b))。hTRF2DBDとtr13の複合体の構造は平均座標に対する個々の構造のrmsdはbackboneで 0.51 ± 0.11 オングストローム、All heavy atoms で 0.68 ± 0.09 であった。複合体内のタンパクの構造はフリーの構造に対して構造変化はなく、またDNAもbendingなどの変化はなかった。

【0085】

複合体におけるDNAの認識

複合体におけるhTRF2DBDのDNAの認識の模式図はFig3(a)に示した。hTRF2DBDはDNAに主溝に対し三番目のヘリックスが深くはまり、Asp489がC7'、C8'をLys488がA4またはG5を認識している。また、Ala484、Val485とT3のメチル基が疎水的な相互作用をしている。またMet486とVal485のメチル基がArg489のメチレン基とC7'、C8'の塩基とC7'の糖鎖で疎水性の相互作用がある。その他にThr493のメチル基がA5'の糖鎖と疎水的な相互作用も確認できた。副溝においてはLys447がT9またはA6'を認識している。また、塩基への直接的な認識の他にTrp450、Trp470、Ala471、Lys488、Arg490、Arg492がDNAのリン酸骨格を認識することでDNAとの相互作用を可能にしている。このようなDNAへの認識機構は今まで報告されているホメオドメインやhTRF1との複合体などで見られる。特にhTRF1とは同様のDNA配列を認識し、またDNA結合ドメインの構造もほとんどかわらず、その結合様式が同じであることが確認できた(Fig3(b))。

【0086】

hTRF1とhTRF2のDNAへの認識の違い。

hTRF1(Arg378-Leu430)とhTRF2(Thr445-Leu497)のDNA結合ドメイン領域での相同性はidentityで約59%, similarityで約70%で大変に高い。また、決定されたhTRF1及びhTRF2のDNAへの複合体から、DNAへの認識に関与しているアミノ酸はわずか4残基であり、hTRF2においてLys447、Ala471、Ala484、Arg496である。しかし、この4残基の違いによって、DNAへの主な認識様式の変化はなく、この4残基以外のアミノ酸のDNAへの認識はhTRF1と全く同じであった。この4残基はhTRF1ではそれぞれArg380、Ser404、Ser417、Lys429である。hTRF2ではLys447はDNAの副溝に入りT9を認識している。hTRF1のArg380も同様にT9を

認識しているが、他にA6' も同時に認識している。また、hTRF2のAla471の主鎖のNHはT3のリン酸を認識している。またAla484の側鎖のメチル基はT3のメチル基と疎水性の相互作用をしている。hTRF1ではこの2つの残基はSerに変わっており、Ala471に相当するSer404の主鎖の認識は同じであるが、側鎖もリン酸基への認識をしており、Ser417でもAla484同様に疎水性の相互作用のほかにリン酸基への認識が確認できた(Fig.5)。また、Arg496はhTRF2ではDNAへの相互作用に関与しておらず、hTRF1のLys429はT4' のリン酸基を認識しているが、認識している構造は半分にも満たないことからDNAの認識ほとんど寄与してないのではないかと考えられる。hTRF2はhTRF1と4つのアミノ酸に違いがあることで若干、水素結合の数が少ない。このことからhTRF2はhTRF1よりも親和性が弱いことが予想される。

【0087】

DNAへのaffinity解析

DNA認識においてhTRF1と違う4つのアミノ酸に対してhTRF1と同じになるように変異体を作成し、wild typeとの違いを調べた。変異体はK447R、A471S、A484S、K496R、qm(K447R、A471S、A484S、K496R)、dm(A471S、A484S)の6つを作成した。まず、この変異体に対しNMRでtr13に対する滴定実験を行なった。各変異体に対する滴定実験のDNAのイミドプロトンでのスペクトルの結果とwild typeとの化学シフトの差をFig6に示した。K447RではG7、T8、T9に大きな変化が見られた。このことから、副溝に入るLys447をArgに変えることでT9以外にもA6' も認識していると考えられる。この違いが実際DNAへの親和性にどのような違いがあるか調べるためにaffinity実験を表面プラズマ共鳴(Surface plasmon resonance; SPR)を使って行なった。

まず、hTRF2WTのtr13(5' -GTTAGGGTTAGGG-3')への解離定数(KD)は10mM HEPES-KOH pH 6.8, 3mMEDTA, 180mMKCl, 0.003%(v/v) X-100の条件では $KD=(7.48 \pm 0.21) \times 10^{-7} M$ であった。次に特異的認識に使われている塩基を変えた3つのDNA; T3→G3(T3G)、G7→C7(G7C)、T9→G9(T9G)についても同様の実験を行なった。その結果T3G; $KD=(5.94 \pm 0.24) \times 10^{-6} M$ 、G7C; $KD=(5.33 \pm 0.88) \times 10^{-5} M$ 、T9G; $KD=(1.10 \pm 0.06) \times 10^{-4} M$ であった(表2)。T9GのKD値がtr13に比べ100倍以上、大きいことから、特に重要な塩基であることがわかる。また同様の実験をhTRF2の各変異体を使って同条件で行なったところ、R496Kを除く変異体はWTに比べ親和性が上がった。特に4つの変異を入れたqmはWTに比べ約4倍(qm ; $KD=(1.96 \pm 0.09) \times 10^{-7} M$)も親和性が高い。また各変異体ではK447R; $KD=(2.97 \pm 0.18) \times 10^{-7} M$ 、A471S; $KD=(4.82 \pm 0.20) \times 10^{-7} M$ 、A484S; $KD=(5.50 \pm 0.17) \times 10^{-7} M$ 、R496K; $KD=(7.64 \pm 0.21) \times 10^{-7} M$ であり、T9を認識するK447Rの親和性が他の変異体に比べて高いことがわかる。このことからN末端の副溝に対する認識がDNA結合ドメインのDNAへの親和性に大きく寄与しており、hTRF2がLysで認識していることでhTRF1よりもDNAへの親和性が低いことがわかる。また、T3G、G7C、T9Gに対しても同様な実験を行なったところT3Gはtr13に比べ相対的にKDが約7倍、T9Gは約100倍高くなっている。しかし、G7Cではqmに比べK447Rの方がKD値が低くなるなど、T3GやT9Gと各変異体との親和性の傾向が異なっている。G7CではC7' がG' になっており、C7' を認識するAsp489がDNAを認識できなくなっているため主溝内での特異的な認識ができなくなっており、DNAへの認識が非特異的になっていると思われる。T9Gへの親和性はG7Cに比べ10倍も弱い各変異とDNAのKD値の違いはtr13、T3Gと相対的に同じ傾向を示しており、主溝と認識ヘリックスとの結合様式は変わらず、単純に親和性だけが極めて大きく落ちていると思われる。このことからN末端の副溝への認識がDNAへの親和性に大きな影響を与えていることが示された。

また同様の実験をhTRF1についても同条件でおこなった。hTRF1はtr13への解離定数は $KD=(1.86 \pm 0.06) \times 10^{-7} M$ で、ほとんどqmと同じ値を示した。

【0088】

ホメオドメインとの比較

ホメオドメインはMybドメイン同様3本のヘリックスからなっており、第2、第3ヘリックスがヘリックス・ターン・ヘリックス (HTH) を形成し、三番目のヘリックスが認識ヘリックスとしてDNAの主溝に深く入って塩基を認識する。一般的に1つのDNA結合モチーフが認識できる配列は約4-5塩基対であるが、c-MybやscRap1pのように認識モチーフをもったサブドメインが複数存在し、それらが強調してDNAを認識するものや、分子間でホモダイマーやヘテロダイマーを形成してDNAを認識することで、識別できる塩基配列の長さが広がり、その結果タンパク質がDNAと相互作用できる範囲が大きくなりDNAに対する親和性が増加すると同時に塩基配列の選択性がより高くなる。しかし、ホメオドメインのいくつかはHTHモチーフのほかにN末端やC末端のアームも塩基の認識に関与しているため、認識範囲が約7-10塩基対にわたり、DNAとの接触面も広く、1つのドメインのみでDNAに結合できる。hTRF1やhTRF2はダイマーでDNAに結合するが、DNA結合タンパク質間の相互作用はなく1つのDNA結合ドメイン単独でDNAに結合できる。これはホメオドメイン同様にN末端のアームがDNAの副溝を認識することで可能になっている。DNAとの複合体で構造が決定されているホメオドメインは、ほとんどの場合Argが副溝のTA塩基を認識している。MATa1ではLysが認識しているが、MATa1とMAT α 2はDNAとヘテロダイマーを形成し、DNAの同じ側から隣り合った主溝に、認識ヘリックスが同じ方向を向くように結合することから、1つのDNA結合モチーフ単独での結合ではない。Lysに比べArgが副溝のATに富んだ配列に対して認識すると、その近辺の塩基やリン酸基も同時に認識できるので高い親和性でDNAを認識できる。また、複合体での構造解析がなされていないホメオドメインでも5番目のArgはよく保存されていることから、副溝への認識にArgが使われるのがLysよりも優位だと考えられる。NMRやSPRの結果からhTRF2は副溝をLysで認識するためにhTRF1よりもDNAに対して親和性が弱いことがわかる。それに加えてAla471やAla484での相互作用はhTRF1に比べて水素結合の数も少ないので、hTRF1よりもDNAに対して解離しやすくなっている。

【0089】

Biological Implication

hTRF1とhTRF2はC末端にMybドメインが存在し、ホモ2量体でDNAに結合する。しかし、Mybドメイン同士が協同的に結合するのではなく、1つのMybドメイン単独で結合する。そのhTRF1とhTRF2のMybドメインの相同性は非常に高く、今回の構造解析の結果hTRF1とhTRF2のDNAへの認識はほとんど変わらないことがわかった。しかし、ホモ2量体のhTRF1の2つのMybドメインは近隣のテロメア配列に結合するだけでなく、離れたテロメア配列に結合しDNAを曲げることがin vitroで報告されている。hTRF2にはそのような結合様式はない。hTRF2は3' 突出末端の1番最初にTTAGGGの配列が1つでもあれば2本鎖と1本鎖の結合部位にある2本鎖側に結合しやすくなることが報告されている。また、t-loop構造内ではD-loopにTRF2は結合することも報告されている。hTRF2のMybドメインは今回の解析の結果、hTRF1同様に3' 突出末端の近傍以外の大部分を占める2本鎖のテロメア配列に結合するはずである。しかし、hTRF2の結合部位が3' 突出末端に偏っていることから、1度、hTRF1同様に2本鎖テロメア配列に結合したhTRF2はhRap1やMre11 complexなどのhTRF2に相互作用する他のタンパク質や、または1本鎖DNAの影響で、3' 突出末端近傍に集められ、その後t-loopの形成など機能するのではないかと考えられる。そのためにはhTRF1のように強い親和性でDNAに結合するのではなく、弱い親和性でDNAに結合したほうが、テロメア配列間を動くのに有利に働くのではないかと思える。

【0090】

『実験手順』

タンパク質及びDNAの調製

TRF2全長のDNAをコードするプラスミドに対し40塩基からなるTRF2-DBDをコードするDNAのプライマーを5' 側、3' 側を用意し、PCR方によりTRF2-DBD部位をコードするDNAを増幅

した。増幅したDNAをNdeI、EcoRIで制限酵素処理し、pET23bベクターに対しライゲーションし、得られたベクターを大腸菌BL21 (DE3) にトランスフォームした。

また、上記の2種類のプライマーのほかに変異体部位のアミノ酸をコードしたプライマーを5' 側、3' 側を用意した。変異体部位に対し5' 側と3' 側の2つを別々にPCR方で増幅した。得られた2本のDNAとTRF2-DBD部位の5' 側と3' 側のプライマーを混ぜPCRで増幅することで変異体をコードしたTRF2-DBD(変異体)のDNAが得られる。得られたDNAに対しTRF2-DBD同様に制限酵素、ライゲーション処理を行なって発現ベクターを得た。得られたベクターはBL21 (DE3) にトランスフォームした。

変異体作成に使用したプライマーの配列を以下に示す。上段が5' 側、下段が3' 側である。K447Rは5' 側のみ、R496Kは3' 側のみである。

TRF2DBD

5' -ggctctgcatatggaagacagtacaaccaatataac-3' (配列番号 2 2)

5' -gcgggaattctcagttcatgcccaagtcttttc-3' (配列番号 2 3)

TRF2DBD (A471S)

5' -ggaaactggctctgccatttctaaaaat-3' (配列番号 2 4)

5' -agaaatggcagaccagtttccttcccc-3' (配列番号 2 5)

TRF2DBD (A483S)

5' -aaccgaacatctgtgatgattaaggat-3' (配列番号 2 6)

5' -aatcatcacagatgttcggttaacaaa-3' (配列番号 2 7)

TRF2DBD (K447R)

5' -ggctctgcatatggaagacagtacaaccaatataacaaaaaggcagaagtgg-3' (配列番号 2 8)

TRF2DBD (R496K)

5' -ggaattctcagttcatgcccaagttttttcatgggtccg-5' (配列番号 2 9)

TRF2のDNA結合ドメイン (hTRF2-DBD: N末端にMetが付加したGlu438からAsn500までのアミノ酸配列) 及び各変異体を大腸菌BL21 (DE3) 株 (Novagen) においてpET23bベクターを用いて過剰発現させた。細胞を37℃で培養した。OD₆₀₀が0.5~0.6に達したとき、1mMのイソプロピル- β -D-ガラクトピラノシド (IPTG) を添加して、25℃でタンパク質発現を誘導した。さらに3時間培養した後、細胞を回収し、バッファー (50mMリン酸カリウムバッファー (pH7.0)、5mM EDTA、100mM NaCl) 中に再懸濁した。同位体標識のため、¹⁵NH₄Cl (0.15%) 及び/又は [¹³C]-グルコース (0.2%) を含有するM9最小培地を用いた。TRF2-DBDを以下の精製手順で精製した。細胞を氷上で超音波処理にて溶解した後、遠心 (39,000g) した。上清をバッファー (50mMリン酸カリウムバッファー (pH7.0)、5mM EDTA、100mM NaCl) で平衡化したリン酸セルロース (p11, Whatman) カラムにロードし、150mM、200mM及び250mM NaClで段階的に溶出した。目的のタンパク質を含有する画分を回収し、3kDaカットオフ膜を有するcentriprep (Amicon) 又はVivaspin (VIVASCIENCE) を用いて濃縮し、体積を2mL以下にした。このサンプルをバッファー (50mMリン酸カリウムバッファー (pH7.0)、5mM EDTA、300mM KCl) で平衡化したゲル濾過カラム (Superdex 30; Pharmacia) にアプライした。サンプルの同定と純度はMALDI-TOF質量分析法及び電気泳動により行った。

本実施例で用いるオリゴヌクレオチドフラグメント (5' -GTTAGGGTTAGGG-3') (配列番号 1 7) はBex Co. Ltd (日本) から購入した。二重らせんの各鎖はバッファー (50mMリン酸カリウム (pH7.0)、1mM EDTA、150mM KCl) 中で当モル比で混合し、95℃から室温までゆっくりと冷却することによりアニールした。このサンプルをバッファー (50mMリン酸カリウムバッファー (pH7.0)、5mM EDTA、300mM KCl) で平衡化したゲル濾過カラム (Superdex 30; Pharmacia) にアプライした。

凝集を避けるために、タンパク質とDNAの両方を50mMリン酸カリウム (pH7.0)、150mM KCl

に溶解し、当モル比になるまで、タンパク質を徐々にDNA溶液に添加することにより複合体を形成した。サンプルを10%D₂O(v/v)中で5mMリン酸カリウム(pH6.9)で透析した。

【0091】

NMR分析法

10%(v/v)又は100%D₂Oを含有する5mMリン酸カリウムバッファー (pH6.9) 中の1.0-1.5mMのTRF2-DBD-DNA複合体をNMR実験に用いた。NMR実験は303KでBruker DMX-600及び-800上で行った。タンパク質の主鎖のアサイメントは3D HN(CO)CA, 3D HNCA, 3D HNC(O) (Grzesiek, S. & Bax, A. Improved three-dimensional triple resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. J. Magn. Reson. 96, 432-440. (1992a)), 3DHN (CA) CO, 3D CBCANH及び3D CBCA(CO)NH (Grzesiek S and Bax A (1992b) Correlating backbone amide and side-chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. J. Am. Chem. Soc. 114, 6291-6293.) から得た。タンパク質側鎖のアサイメントは、3D HBHA(CO)NH(1992b), 3D HCCH-TOCSY (Kay LE, Xu G-Y, Singer AU, Muhandiram DR and Forman-Kay JD (1993) A gradient-enhanced HCCH-TOCSY experiment for recording side-chain 1H and 13C correlations in H2O sample of protein. J. Magn. Reson. B. 101, 333-337.), 3D HCCH-COSY, 3D 15N-edited NOESY, 及び3D 15N-edited TOCSY 実験から得た。主鎖の二面角φ制限に対する3JHNα結合定数は3D HNHA(Vuister GW and Bax A (1993) Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three bond J-(HN-Hα) coupling constants in 15N-enriched protein. J. Am. Chem. Soc., 115, 7772-7777.) 実験により測定した。

DNA共鳴のアサイメント及び分子内距離制限は2D NOESY, 2D TOCSY, 及び13C 又は13C/15N filtered pulse scheme付き2D DQF-COSY (Ogura K, Terasawa H and Inagaki F (1996) An improved double-tuned and isotope-filtered pulse scheme based on a pulse field gradient and a wide-band inversion shaped pulse. J. Biomol. NMR, 8, 492-498.) から得た。分子間距離制限は、3D 13C-edited(F1), 13C-filtered(F3) NOESY 実験及び3D 15N-edited(F2), 15N/13C-filtered(F3) NOESY 実験(Ogura K, Terasawa H and Inagaki F (1996) An improved double-tuned and isotope-filtered pulse scheme based on a pulse field gradient and a wide-band inversion shaped pulse. J. Biomol. NMR, 8, 492-498.) から得た。すべてのNMRスペクトルをNMRPipe (Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J and Bax A (1995) NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX PIPES. J. Biomol. NMR, 6, 277-293.) 及びPIPP (Garrett DS, Powers R, Gronenborn AM and Clore GM (1991) A common sense approach to peak picking in two-, three-, and four-dimensional spectra using automatic computer analysis of contour diagrams. J. Magn. Reson., 99, 214-220.) ソフトウェアを用いて、処理及び解析した。

【0092】

構造計算

TRF2-DBDのプロトン間距離制限はNOESYスペクトルのクロスピーク強度から導き出した。NOEを、それぞれ、強い、中程度、弱い、非常に弱いNOEに相当する1.8-3.0、2.3-4.0、2.3-5.0及び2.3-6.0オングストロームの4つの距離レンジに分類した。さらに、ねじれ角制限を3JHNα結合定数から導き出した。制限角の範囲は、3JHNα<5.5Hzに対して-90°<φ<-40°、3JHNα>8.5Hz に対して-160°<φ<-80° にした。分子内DNAのNOEを、それぞれ、強い、中程度、弱い、非常に弱いNOEに相当する1.8-3.0、2.3-4.0、2.3-5.0及び2.3-6.0オングストロームの4つの距離レンジに分類した。偽原子補正を上限に対して適用した。DNA内の水素結合制限を用いて、塩基対を維持した。以下の水素結合制限により、ワトソン-クリック塩基対形成をDNA中に維持した。GC塩基対に対しては、rg(N1)-C(N3) = 2.95 ± 0.2オングストローム, rg(N2)-C(O2) = 2.86 ± 0.2オングストローム, 及びrg(O6)-C(N4) = 2.91 ± 0.2オングストローム、TA塩基対に対しては、ra(N6)-T(O4) = 2.95 ± 0.2オ

グストローム, 及び $r_{A(N1)-T(N3)} = 2.82 \pm 0.2$ オングストローム (Grpnborn, A.M. & Clore, G.M. Three-dimensional structure of proteins in by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Protein Seq Date Anal. 2, 1-28. (1989)). このDNAに対するゆるいねじれ角制限を用いて、A形及びB形DNAの両方を満たす角度制限 ($\alpha = -65 \pm 50^\circ$, $\beta = 180 \pm 50^\circ$, $\gamma = 60 \pm 50^\circ$, $\epsilon = 180 \pm 50^\circ$, 及び $\zeta = -85 \pm 50^\circ$) (Omichinski, J.G., Pedone, P.V., Felsenfeld, G., Gronenborn, A.M. & Clore, G.M. The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode. Nat. Struct. Biol. 4, 122-132. (1997); Wojciak, J.M., Connolly, K.M. & Clubb, R.T. NMR structure of the Tn916 integrase-DNA complex. Nat. Struct. Biol. 6, 366-373. (1999))にした。DNAに対するNOEのパターンはB形DNAに典型的なものであるのもので、DNAに対するこれらの水素結合及びねじれ角制限は正当なものだと判断される (Wuthrich, K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. Wiley, New York. (1986).)。

最初に、crystallography and NMR System (CNS; Yale University)を用いて、タンパク質のみの200個の構造を計算した。次に、B形DNA及び計算した200個のhTRF2-DBDからスタートして、全てのNOEを用いてhTRF2-DNA複合体の構造をsimulated annealing protocols計算した。B形DNAは種々の配向でタンパク質から50オングストローム離れた位置に配置した。全部で、200個の構造のhTRF2-DNA複合体が計算された。これらのうち、52個が距離制限が0.3 オングストローム以下、角度制限が 5° 以下を満たしており、エネルギーが最も低い構造的に矛盾のない構造を20個選んだ。

【0093】

表面プラズマ共鳴分析

affinity分析をBiacore3000装置を用いて行った。すべての実験は293Kで10mM HEPES-KOH, 3mM EDTA, 180mM KCl 及び0.003% Triton X-100 (v/v) (pH6.8)を含有するバッファーを用いて行った。SAストレプトアビジンセンサーチップのフローセルをビオチン化された13merのオリゴヌクレオチドでコートした。タンパク質とDNAの反応が平衡化するまで、タンパク質を3-5分間かけて $10 \mu\text{L}/\text{分}$ の流速でフローセルに注入した。2M KClで30秒間洗浄することにより、結合したタンパク質を除去した。平衡解離定数 (KD)を各アナライト濃度でセンサーグラムの平衡領域におけるRU値のスキッチャード分析から計算した。BIAevaluation ver.3.2を用い、この親和性データを分析した。

【0094】

【表 1】

Structural statistics for 20 structures of hTRF2complex and 25 structures of hTRF2

Protein

Distance restraints

intra residue ($i-j=0$)	218	196
medium range ($ i-j <5$)	573	511
long range ($ i-j \geq 5$)	231	203

total	1022	910
-------	------	-----

Dihedral angle restraints ϕ	38	42
----------------------------------	----	----

DNA

Distance restraints

intra residue	131
sequential	162
interstrand	4

total	297
-------	-----

Protein-DNA

TOTAL	1450
-------	------

Statistic for structure calculations	<SA>	<SA>
--------------------------------------	------	------

R.m.s. deviations from experimental restraints

NOE(Å)	$(4.70 \pm 0.70) \times 10^{-3}$	$(2.46 \pm 0.06) \times 10^{-3}$
dihedrals(deg.)	$(1.93 \pm 1.18) \times 10^{-2}$	$(5.28 \pm 3.49) \times 10^{-2}$

R.m.s. deviations from ideal restraints

bonds(Å)	$(1.10 \pm 0.05) \times 10^{-3}$	$(1.29 \pm 0.03) \times 10^{-3}$
angles(deg.)	$(2.85 \pm 0.04) \times 10^{-1}$	$(4.64 \pm 0.03) \times 10^{-1}$
impropers (deg.)	$(1.60 \pm 0.07) \times 10^{-1}$	$(3.39 \pm 0.04) \times 10^{-1}$

complex:residue 447-496 for protein, base-DNA 1-11(3'-13') for DNA

free:residue 450-496 for protein

R.m.s. deviations of Atomis coordinates (Å)	backbone/all heavy atoms	backbone/all heavy atoms
Protein	$0.43 \pm 0.09 / 0.81 \pm 0.08$	$0.49 \pm 0.09 / 0.95 \pm 0.08$
DNA	$0.43 \pm 0.14 / 0.38 \pm 0.13$	
Protein-DNA	$0.51 \pm 0.11 / 0.68 \pm 0.09$	

PROCHEK Ramachndran plotstastistcs (%)

Residues in most favoured regions	83.5	81.2
Residues in additinal allowed regions	15.5	16.1
Residues in generously allowed regions	0.9	2.7
Residues in disallowed regions	0.0	0.0

【 0 0 9 5 】

【表 2】

10mM HEPES-KOH pH6.8, 3mM EDTA, 180mM KCl, 0.003%(v/v) X-100

KD (M)

	hTRF1	hTRF2	qm	dm	K447R	A471S	A484S	R496K
tr13	$(1.86 \pm 0.06) \times 10^{-7}$	$(7.48 \pm 0.21) \times 10^{-7}$	$(1.96 \pm 0.09) \times 10^{-7}$	$(3.85 \pm 0.17) \times 10^{-7}$	$(2.97 \pm 0.18) \times 10^{-7}$	$(4.82 \pm 0.20) \times 10^{-7}$	$(5.50 \pm 0.17) \times 10^{-7}$	$(7.64 \pm 0.21) \times 10^{-7}$
T3G	$(7.95 \pm 0.41) \times 10^{-7}$	$(5.94 \pm 0.24) \times 10^{-6}$	$(9.02 \pm 0.39) \times 10^{-6}$	$(2.58 \pm 0.14) \times 10^{-6}$	$(2.19 \pm 0.13) \times 10^{-6}$	$(3.07 \pm 0.13) \times 10^{-6}$	$(4.03 \pm 0.15) \times 10^{-6}$	$(4.92 \pm 0.17) \times 10^{-6}$
G7C	$(1.22 \pm 0.22) \times 10^{-5}$	$(5.33 \pm 0.88) \times 10^{-5}$	$(4.44 \pm 0.43) \times 10^{-6}$	$(3.38 \pm 0.32) \times 10^{-5}$	$(2.45 \pm 0.17) \times 10^{-5}$	$(3.23 \pm 0.28) \times 10^{-5}$	$(5.07 \pm 0.47) \times 10^{-5}$	$(8.70 \pm 1.13) \times 10^{-5}$
T9G	$(3.14 \pm 0.14) \times 10^{-6}$	$(1.10 \pm 0.06) \times 10^{-4}$	$(2.65 \pm 0.09) \times 10^{-5}$	$(4.79 \pm 0.25) \times 10^{-5}$	$(3.70 \pm 0.21) \times 10^{-5}$	$(4.42 \pm 0.13) \times 10^{-5}$	$(6.91 \pm 0.35) \times 10^{-5}$	$(1.14 \pm 0.12) \times 10^{-4}$

【産業上の利用可能性】

【0096】

本発明により、TRF2のテロメア二重らせんDNA結合能が野生型より非常に強い変異体が提供された。本発明の変異体は、TRF2が関与する事象（例えば、癌、老化、アポトーシスなど）の制御に利用することができる。例えば、本発明の変異体を利用して、老化やアポトーシスを防止できると考えられる。

【0097】

また、本発明により、テロメアタンパク質TRF2 DNA結合ドメインとテロメア二重らせんDNAとの複合体構造とその機能が解析され、TRF2のDNAへの結合能を調節できる薬剤のスクリーニングが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1(a)】主なMybドメインを含むテロメアタンパク質とc-Mybのドメイン構造の概要図、basic:塩基性ドメイン、acidic:酸性ドメイン、TRFH:TRFホモロジードメイン、BRCT:BRCA1ホモロジードメイン、RCT:Rap1 C末端ホモロジードメイン、active:転写活性化ドメイン、negative regulation:転写抑制ドメイン、Myb:Mybホモロジードメイン、DNA binding:DNA結合能があるMyb領域

【図1(b)】主なテロメアタンパク質のMybドメインとc-Mybの各リピート(R1、R2、R3)のアミノ酸配列。アンダーラインはヘリックス領域を示している。また点線は分子内の架橋を形成している残基を繋いだ。

【図2(a)】TRF2-DBDのステレオ図。上は25個の中で最もエネルギーの低い構造であり、下は25個の重ね書きである。

【図2(b)】TRF2-DBDとDNAとの複合体のステレオ図。(a)は20個の中で最もエネルギーの低い構造であり、(b)は20個の重ね書きである。

【図3(a)】NMRで決定した構造から得られたTRF1とTRF2のDNAへの認識模式図。矢印は静電的な相互作用を示し、点線での矢印は疎水性の相互作用を示す。

【図3(b)】TRF1とTRF2の静電分布図。青が正電荷、赤が負電荷を帯びている。表示したアミノ酸はDNAの認識に関わる残基で、赤で表示したのがTRF1とTRF2で異なるアミノ酸を示す。

【図4】TRF2の主溝の認識。点線の円で囲まれた部位はT3、Val485、Ala484で形成される疎水性の相互作用。Asp489とC7'、C8'を結ぶ線は水素結合を示す。

【図5(a)】TRF1とTRF2の副溝を認識する模式図。上の値はArg380のN1、N2とT9のO2、A6'のN3の距離(オングストローム)と、Lys447とT9のO2、A6'のN3の距離(オングストローム)を示している。また下の括弧内は得られた20個の構造のうちN-H...D(0 or N): H...D distance<2.7オングストローム; N...D distance<3.4オングストローム; N-H-D angle>90°を満たす位置関係にある数を示した。

【図5(b)】TRF1とTRF2のSer404/Ala471とSer417/Ala484とT3のリン酸骨格との相互作用を示した。線は水素結合を示している。

【図6(a)】TRF2の各DBDとtr13(5'-d(GTTAGGGTTAGGG))のモル濃度が1:1のときのDNAのイミノプロトン領域のシグナル。

【図6(b)】図6(a)で得られた変異体のイミノプロトンの化学シフトの値から野生型を引いた値のグラフ

【図7】SPRで得られたTRF2、各DBDの解離定数(KD)をtr13、T3G、G7C、T9Gについてのグラフ

【図8】構造が登録されているホメオドメインのアミノ酸のアライメント。保存されている疎水性のアミノ酸を黄色、5番目のアミノ酸をシアンで囲った。

【配列表フリーテキスト】

【0099】

<配列番号1>

- 配列番号 1 は、野生型hTRF2-DBDのDNA配列を示す。
- <配列番号 2 >
配列番号 2 は、野生型hTRF2-DBDのアミノ酸配列を示す。
- <配列番号 3 >
配列番号 3 は、変異体K447RのDNA配列を示す。
- <配列番号 4 >
配列番号 4 は、変異体K447Rのアミノ酸配列を示す。
- <配列番号 5 >
配列番号 5 は、変異体A471SのDNA配列を示す。
- <配列番号 6 >
配列番号 6 は、変異体A471Sのアミノ酸配列を示す。
- <配列番号 7 >
配列番号 7 は、変異体A484SのDNA配列を示す。
- <配列番号 8 >
配列番号 8 は、変異体A484Sのアミノ酸配列を示す。
- <配列番号 9 >
配列番号 9 は、変異体K496RのDNA配列を示す。
- <配列番号 1 0 >
配列番号 1 0 は、変異体K496Rのアミノ酸配列を示す。
- <配列番号 1 1 >
配列番号 1 1 は、変異体qmのDNA配列を示す。
- <配列番号 1 2 >
配列番号 1 2 は、変異体qmのアミノ酸配列を示す。
- <配列番号 1 3 >
配列番号 1 3 は、変異体dmのDNA配列を示す。
- <配列番号 1 4 >
配列番号 1 4 は、変異体dmのアミノ酸配列を示す。
- <配列番号 1 5 >
配列番号 1 5 は、野生型hTRF2のDNA配列を示す。
- <配列番号 1 6 >
配列番号 1 6 は、野生型hTRF2のアミノ酸配列を示す。
- <配列番号 1 7 >
配列番号 1 7 は、二重らせんDNAであるtr13の一方の鎖のDNA配列を示す。
- <配列番号 1 8 >
配列番号 1 8 は、二重らせんDNAであるtr13の他方の鎖のDNA配列を示す。
- <配列番号 1 9 >
配列番号 1 9 は、テロメアDNAの変異体であるT3GのDNA配列を示す。
- <配列番号 2 0 >
配列番号 2 0 は、テロメアDNAの変異体であるG7CのDNA配列を示す。
- <配列番号 2 1 >
配列番号 2 1 は、テロメアDNAの変異体であるT9GのDNA配列を示す。
- <配列番号 2 2 >
配列番号 2 2 は、TRF2-DBD部位の5' 側のプライマーの配列を示す。
- <配列番号 2 3 >
配列番号 2 3 は、TRF2-DBD部位の3' 側のプライマーの配列を示す。
- <配列番号 2 4 >
配列番号 2 4 は、TRF2-DBD変異体A471S部位の5' 側のプライマーの配列を示す。
- <配列番号 2 5 >
配列番号 2 5 は、TRF2-DBD変異体A471S部位の3' 側のプライマーの配列を示す。
- <配列番号 2 6 >

- 配列番号 2 6 は、TRF2-DBD変異体A483S部位の5' 側のプライマーの配列を示す。
- <配列番号 2 7>
- 配列番号 2 7 は、TRF2-DBD変異体A483S部位の3' 側のプライマーの配列を示す。
- <配列番号 2 8>
- 配列番号 2 8 は、TRF2-DBD変異体K447R部位の5' 側のプライマーの配列を示す。
- <配列番号 2 9>
- 配列番号 2 9 は、TRF2-DBD変異体R496K部位の3' 側のプライマーの配列を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency
Yokohama City

<120> TRF2 DNA-binding domain mutant proteins, telomeric DNA mutants, and use of a structure of a complex between a TRF2 DNA binding domain and a double-stranded DNA molecule

<130> P04-002

<160> 29

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 189

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(189)

<223>

<400> 1

gaa	gac	agt	aca	acc	aat	ata	aca	aaa	aag	cag	aag	tgg	act	gta	gaa	48
Glu	Asp	Ser	Thr	Thr	Asn	Ile	Thr	Lys	Lys	Gln	Lys	Trp	Thr	Val	Glu	
1				5					10					15		

gaa	agc	gag	tgg	gtc	aag	gct	gga	gtg	cag	aaa	tat	ggg	gaa	gga	aac	96
Glu	Ser	Glu	Trp	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Glu	Gly	Asn	
		20					25						30			

tgg	gct	gcc	att	tct	aaa	aat	tac	cca	ttt	gtt	aac	cga	aca	gct	gtg	144
Trp	Ala	Ala	Ile	Ser	Lys	Asn	Tyr	Pro	Phe	Val	Asn	Arg	Thr	Ala	Val	
		35					40					45				

atg	att	aag	gat	cgc	tgg	cgg	acc	atg	aaa	aga	ctt	ggc	atg	aac	189
Met	Ile	Lys	Asp	Arg	Trp	Arg	Thr	Met	Lys	Arg	Leu	Gly	Met	Asn	
		50				55					60				

<210> 2

<211> 63

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
1 5 10 15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
20 25 30

Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
35 40 45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
50 55 60

<210> 3
<211> 189
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(189)
<223>

<400> 3
gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa agg cag aag tgg act gta gaa 48
Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Arg Gln Lys Trp Thr Val Glu
1 5 10 15

gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac 96
Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
20 25 30

tgg gct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca gct gtg 144
Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
35 40 45

atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga ctt ggc atg aac 189
Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
50 55 60

<210> 4
<211> 63

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 4

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Arg Gln Lys Trp Thr Val Glu
1 5 10 15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
20 25 30

Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
35 40 45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
50 55 60

<210> 5
<211> 189
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(189)
<223>

<400> 5
gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa aag cag aag tgg act gta gaa 48
Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
1 5 10 15

gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac 96
Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
20 25 30

tgg tct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca gct gtg 144
Trp Ser Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
35 40 45

atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga ctt ggc atg aac
 Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

189

<210> 6
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 6

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

Trp Ser Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
 35 40 45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 7
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(189)
 <223>

<400> 7

gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa aag cag aag tgg act gta gaa
 Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

48

gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac
 96

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

tgg gct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca tct gtg 144
 Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ser Val
 35 40 45

atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga ctt ggc atg aac 189
 Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 8
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 8

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ser Val
 35 40 45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 9
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(189)
 <223>

<400> 9
 gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa aag cag aag tgg act gta gaa 48
 Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15
 gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac 96
 Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30
 tgg gct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca gct gtg 144
 Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
 35 40 45
 atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aag ctt ggc atg aac 189
 Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Lys Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 10
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 10
 Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15
 Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30
 Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
 35 40 45
 Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Lys Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 11
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(189)

<223>

<400> 11

gaa	gac	agt	aca	acc	aat	ata	aca	aaa	agg	cag	aag	tgg	act	gta	gaa	48
Glu	Asp	Ser	Thr	Thr	Asn	Ile	Thr	Lys	Arg	Gln	Lys	Trp	Thr	Val	Glu	
1				5					10					15		

gaa	agc	gag	tgg	gtc	aag	gct	gga	gtg	cag	aaa	tat	ggg	gaa	gga	aac	96
Glu	Ser	Glu	Trp	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Glu	Gly	Asn	
		20					25						30			

tgg	tct	gcc	att	tct	aaa	aat	tac	cca	ttt	gtt	aac	cga	aca	tct	gtg	144
Trp	Ser	Ala	Ile	Ser	Lys	Asn	Tyr	Pro	Phe	Val	Asn	Arg	Thr	Ser	Val	
		35					40					45				

atg	att	aag	gat	cgc	tgg	cgg	acc	atg	aaa	aag	ctt	ggc	atg	aac	189
Met	Ile	Lys	Asp	Arg	Trp	Arg	Thr	Met	Lys	Lys	Leu	Gly	Met	Asn	
		50				55					60				

<210> 12

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 12

Glu	Asp	Ser	Thr	Thr	Asn	Ile	Thr	Lys	Arg	Gln	Lys	Trp	Thr	Val	Glu
1				5					10					15	

Glu	Ser	Glu	Trp	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Glu	Gly	Asn
		20					25						30		

Trp	Ser	Ala	Ile	Ser	Lys	Asn	Tyr	Pro	Phe	Val	Asn	Arg	Thr	Ser	Val
		35					40					45			

Met	Ile	Lys	Asp	Arg	Trp	Arg	Thr	Met	Lys	Lys	Leu	Gly	Met	Asn
		50				55					60			

<210> 13
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(189)
 <223>

<400> 13
 gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa aag cag aag tgg act gta gaa 48
 Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15
 gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac 96
 Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30
 tgg tct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca tct gtg 144
 Trp Ser Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ser Val
 35 40 45
 atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga ctt ggc atg aac 189
 Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 14
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 14

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

Trp Ser Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ser Val
 35 40 45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 15
 <211> 1500
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1500)
 <223>

<400> 15
 atg gcg gga gga ggc ggg agt agc gac ggc agc ggg cgg gca gct ggc 48
 Met Ala Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Gly Ser Gly Arg Ala Ala Gly
 1 5 10 15

agg cgg gcg tcc cgc agt agc ggg cgg gcc cgg cgg ggg cgc cac gag 96
 Arg Arg Ala Ser Arg Ser Ser Gly Arg Ala Arg Arg Gly Arg His Glu
 20 25 30

ccg ggg ctg ggg ggc ccg gcg gag cgc ggc gcg ggg gag gca cgg ctg 144
 Pro Gly Leu Gly Gly Pro Ala Glu Arg Gly Ala Gly Glu Ala Arg Leu
 35 40 45

gaa gag gca gtc aat cgc tgg gtg ctc aag ttc tac ttc cac gag gcg 192
 Glu Glu Ala Val Asn Arg Trp Val Leu Lys Phe Tyr Phe His Glu Ala
 50 55 60

ctg cgg gcc ttt cgg ggt agc cgg tac ggg gac ttc aga cag atc cgg 240
 Leu Arg Ala Phe Arg Gly Ser Arg Tyr Gly Asp Phe Arg Gln Ile Arg
 65 70 75 80

gac atc atg cag gct ttg ctt gtc agg ccc ttg ggg aag gag cac acc 288
 Asp Ile Met Gln Ala Leu Leu Val Arg Pro Leu Gly Lys Glu His Thr
 85 90 95

gtg tcc cga ttg ctg cgg gtt atg cag tgt ctg tcg cgg att gaa gaa 336
 Val Ser Arg Leu Leu Arg Val Met Gln Cys Leu Ser Arg Ile Glu Glu
 100 105 110

ggg gaa aat tta gac tgt tcc ttt gat atg gag gct gag ctc aca cca 384
 Gly Glu Asn Leu Asp Cys Ser Phe Asp Met Glu Ala Glu Leu Thr Pro

115	120	125	
ctg gaa tca gct atc aat gtg ctg gag atg att aaa acg gaa ttt aca Leu Glu Ser Ala Ile Asn Val Leu Glu Met Ile Lys Thr Glu Phe Thr 130 135 140			432
ctg aca gaa gca gtg gtc gaa tcc agt aga aaa ctg gtc aag gaa gct Leu Thr Glu Ala Val Val Glu Ser Ser Arg Lys Leu Val Lys Glu Ala 145 150 155 160			480
gct gtc att att tgt atc aaa aac aaa gaa ttt gaa aag gct tca aaa Ala Val Ile Ile Cys Ile Lys Asn Lys Glu Phe Glu Lys Ala Ser Lys 165 170 175			528
att ttg aaa aaa cat atg tcc aag gac ccc aca act cag aag ctg aga Ile Leu Lys Lys His Met Ser Lys Asp Pro Thr Thr Gln Lys Leu Arg 180 185 190			576
aat gat ctc ctg aat att att cga gaa aag aac ttg gcc cat cct gtt Asn Asp Leu Leu Asn Ile Ile Arg Glu Lys Asn Leu Ala His Pro Val 195 200 205			624
atc cag aac ttt tca tat gag acc ttc cag cag aag atg ctg cgc ttc Ile Gln Asn Phe Ser Tyr Glu Thr Phe Gln Gln Lys Met Leu Arg Phe 210 215 220			672
ctg gag agc cac ctg gat gac gcc gag ccc tac ctc ctc acg atg gcc Leu Glu Ser His Leu Asp Asp Ala Glu Pro Tyr Leu Leu Thr Met Ala 225 230 235 240			720
aaa aag gct ttg aaa tct gag tcc gct gcc tca agt aca ggg aag gaa Lys Lys Ala Leu Lys Ser Glu Ser Ala Ala Ser Ser Thr Gly Lys Glu 245 250 255			768
gat aaa cag cca gca cca ggg cct gtg gaa aag cca ccc aga gaa ccc Asp Lys Gln Pro Ala Pro Gly Pro Val Glu Lys Pro Pro Arg Glu Pro 260 265 270			816
gca agg cag cta cgg aat cct cca acc acc att gga atg atg act ctg Ala Arg Gln Leu Arg Asn Pro Pro Thr Thr Ile Gly Met Met Thr Leu 275 280 285			864
aaa gca gct ttc aag act ctg tct ggt gca cag gat tct gag gca gcc Lys Ala Ala Phe Lys Thr Leu Ser Gly Ala Gln Asp Ser Glu Ala Ala 290 295 300			912
ttt gca aaa ctg gac cag aag gat ctg gtt ctt cct act caa gct ctc Phe Ala Lys Leu Asp Gln Lys Asp Leu Val Leu Pro Thr Gln Ala Leu 305 310 315 320			960

cca gca tca cca gcc ctc aaa aac aag aga ccc aga aaa gat gaa aac Pro Ala Ser Pro Ala Leu Lys Asn Lys Arg Pro Arg Lys Asp Glu Asn 325 330 335	1008
gaa agt tca gcc ccg gct gac ggt gag ggt ggc tcg gaa ctg cag ccc Glu Ser Ser Ala Pro Ala Asp Gly Glu Gly Gly Ser Glu Leu Gln Pro 340 345 350	1056
aag aac aag cgc atg aca ata agc aga ttg gtc ttg gag gag gac agc Lys Asn Lys Arg Met Thr Ile Ser Arg Leu Val Leu Glu Glu Asp Ser 355 360 365	1104
cag agt act gag ccc agc gca ggc ctc aac tcc tcc cag gag gcc gct Gln Ser Thr Glu Pro Ser Ala Gly Leu Asn Ser Ser Gln Glu Ala Ala 370 375 380	1152
tca gcg cca cca tcc aag ccc acc gtt ctc aac caa ccc ctc cct gga Ser Ala Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Leu Asn Gln Pro Leu Pro Gly 385 390 395 400	1200
gag aag aat ccc aaa gta ccc aaa ggc aag tgg aac agc tct aat ggg Glu Lys Asn Pro Lys Val Pro Lys Gly Lys Trp Asn Ser Ser Asn Gly 405 410 415	1248
gtt gaa gaa aag gag act tgg gtg gaa gag gat gaa ctg ttt caa gtt Val Glu Glu Lys Glu Thr Trp Val Glu Glu Asp Glu Leu Phe Gln Val 420 425 430	1296
cag gca gca cca gat gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa aag cag Gln Ala Ala Pro Asp Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln 435 440 445	1344
aag tgg act gta gaa gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa Lys Trp Thr Val Glu Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys 450 455 460	1392
tat ggg gaa gga aac tgg gct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt Tyr Gly Glu Gly Asn Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val 465 470 475 480	1440
aac cga aca gct gtg atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga Asn Arg Thr Ala Val Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg 485 490 495	1488
ctt ggc atg aac Leu Gly Met Asn 500	1500

<211> 500
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Gly Ser Gly Arg Ala Ala Gly
1 5 10 15

Arg Arg Ala Ser Arg Ser Ser Gly Arg Ala Arg Arg Gly Arg His Glu
20 25 30

Pro Gly Leu Gly Gly Pro Ala Glu Arg Gly Ala Gly Glu Ala Arg Leu
35 40 45

Glu Glu Ala Val Asn Arg Trp Val Leu Lys Phe Tyr Phe His Glu Ala
50 55 60

Leu Arg Ala Phe Arg Gly Ser Arg Tyr Gly Asp Phe Arg Gln Ile Arg
65 70 75 80

Asp Ile Met Gln Ala Leu Leu Val Arg Pro Leu Gly Lys Glu His Thr
85 90 95

Val Ser Arg Leu Leu Arg Val Met Gln Cys Leu Ser Arg Ile Glu Glu
100 105 110

Gly Glu Asn Leu Asp Cys Ser Phe Asp Met Glu Ala Glu Leu Thr Pro
115 120 125

Leu Glu Ser Ala Ile Asn Val Leu Glu Met Ile Lys Thr Glu Phe Thr
130 135 140

Leu Thr Glu Ala Val Val Glu Ser Ser Arg Lys Leu Val Lys Glu Ala
145 150 155 160

Ala Val Ile Ile Cys Ile Lys Asn Lys Glu Phe Glu Lys Ala Ser Lys
165 170 175

Ile Leu Lys Lys His Met Ser Lys Asp Pro Thr Thr Gln Lys Leu Arg
 180 185 190

Asn Asp Leu Leu Asn Ile Ile Arg Glu Lys Asn Leu Ala His Pro Val
 195 200 205

Ile Gln Asn Phe Ser Tyr Glu Thr Phe Gln Gln Lys Met Leu Arg Phe
 210 215 220

Leu Glu Ser His Leu Asp Asp Ala Glu Pro Tyr Leu Leu Thr Met Ala
 225 230 235 240

Lys Lys Ala Leu Lys Ser Glu Ser Ala Ala Ser Ser Thr Gly Lys Glu
 245 250 255

Asp Lys Gln Pro Ala Pro Gly Pro Val Glu Lys Pro Pro Arg Glu Pro
 260 265 270

Ala Arg Gln Leu Arg Asn Pro Pro Thr Thr Ile Gly Met Met Thr Leu
 275 280 285

Lys Ala Ala Phe Lys Thr Leu Ser Gly Ala Gln Asp Ser Glu Ala Ala
 290 295 300

Phe Ala Lys Leu Asp Gln Lys Asp Leu Val Leu Pro Thr Gln Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Ala Ser Pro Ala Leu Lys Asn Lys Arg Pro Arg Lys Asp Glu Asn
 325 330 335

Glu Ser Ser Ala Pro Ala Asp Gly Glu Gly Gly Ser Glu Leu Gln Pro
 340 345 350

Lys Asn Lys Arg Met Thr Ile Ser Arg Leu Val Leu Glu Glu Asp Ser
 355 360 365

Gln Ser Thr Glu Pro Ser Ala Gly Leu Asn Ser Ser Gln Glu Ala Ala
 370 375 380

Ser Ala Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Leu Asn Gln Pro Leu Pro Gly
385 390 395 400

Glu Lys Asn Pro Lys Val Pro Lys Gly Lys Trp Asn Ser Ser Asn Gly
405 410 415

Val Glu Glu Lys Glu Thr Trp Val Glu Glu Asp Glu Leu Phe Gln Val
420 425 430

Gln Ala Ala Pro Asp Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln
435 440 445

Lys Trp Thr Val Glu Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys
450 455 460

Tyr Gly Glu Gly Asn Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val
465 470 475 480

Asn Arg Thr Ala Val Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg
485 490 495

Leu Gly Met Asn
500

<210> 17
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 17
gtaggggtta ggg

13

<210> 18
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 18
cccattccca ttc 13

<210> 19
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 19
gtgaggggtta ggg 13

<210> 20
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 20
gttaggctta ggg 13

<210> 21
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 21
gttagggtga ggg 13

<210> 22
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 22

ggtctcgcac atggaagaca gtacaaccaa tataac

36

<210> 23

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 23

gcgggaattc tcagttcatg ccaagtcttt tc

32

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 24

ggaaactggc ctgccatttc taaaaat

27

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 25

agaaatggca gaccagtttc cttcccc

27

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 26
aaccgaacat ctgtgatgat taaggat

27

<210> 27
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 27
aatcatcaca gatgttcggt taacaaa

27

<210> 28
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 28
ggtctcgc atggaagaca gtacaaccaa tataacaaaa aggcagaagt gg

52

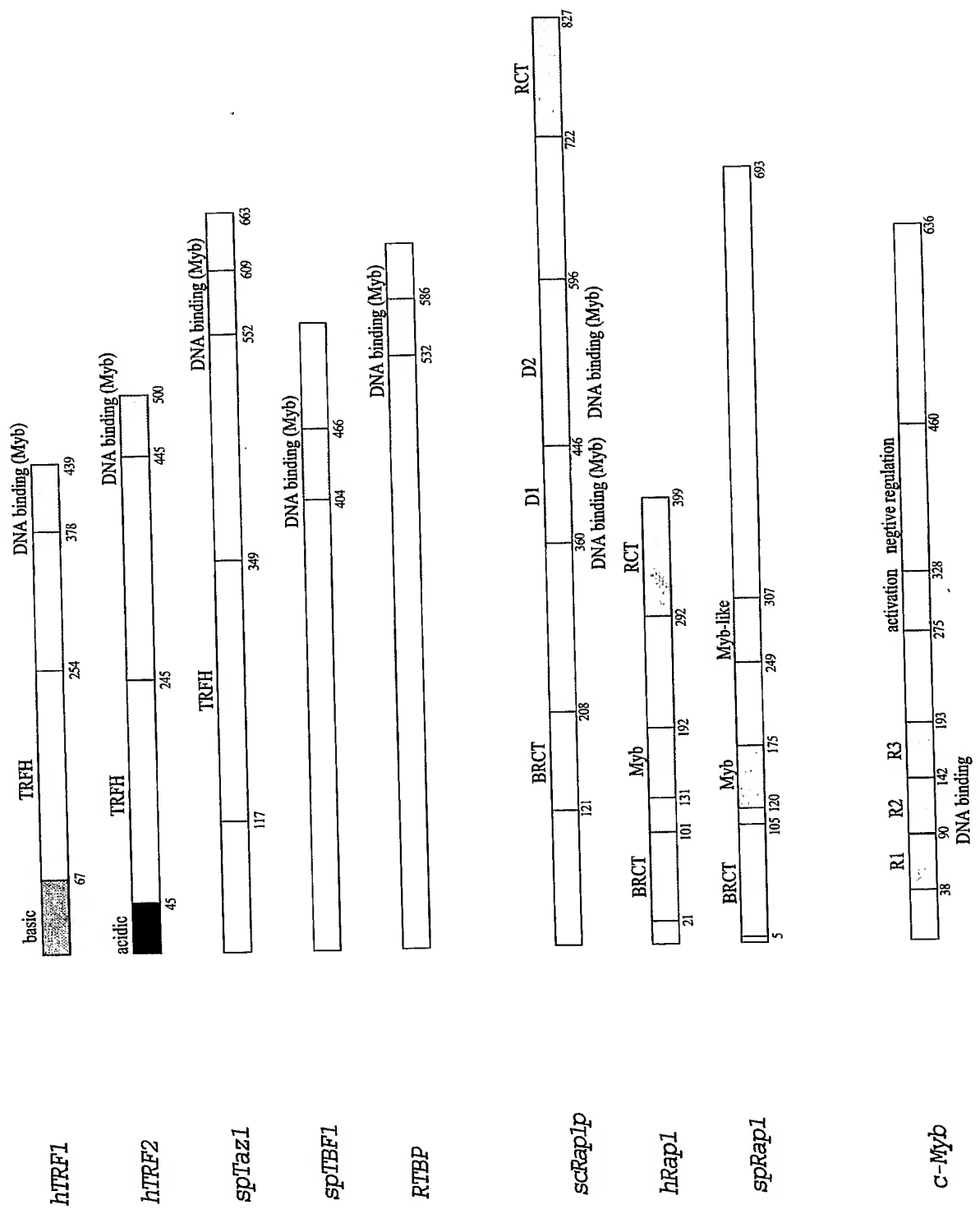
<210> 29
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

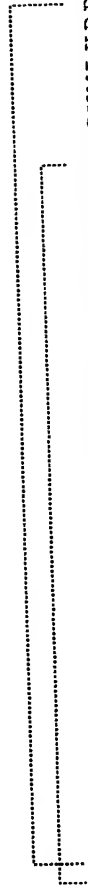
<400> 29
ggaattctca gttcatgcca agttttttca tgggtccg

37

【書類名】 図面
【図 1 (a)】

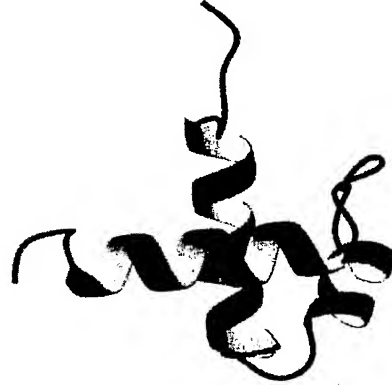


【図 1 (b)】



hTRF1	(378)	RKRQAWLWEEDKNLRSGVRKYG-----EGNWSKILLHYKFNNRTSVMLKDRWRMTMKKL----
hTRF2	(445)	TKKQKWTVEESEWVKAGVQKYG-----EGNWAAISKNYPFVNRTAVMIKDRWRMTMKRL----
spTaz1	(556)	RTRRKWTDDEEENELYEMISQHG-----CCWSKIIHIQK-(8)-FGPTQIKDKARLIKAR----
spTBF1	(407)	KAKRTWSKEEEAALVEGLKEVG-----PSWSKILDLYG-----TQVQLKDKARNWKQLQ----
RTBP	(532)	RIRRPFTVAEVELLVEAVEHLG-----TGRWRDVKFRAF-(6)-TYVDLKDKWKTLVHT----
scRap1p D1	(360)	--KASFTDEEDEFILDVVRKNP----(5)----HTLYDEISHYVP--NHTGNSIRHRFRVYLSK----
scRap1p D2	(446)	--KRKFSADEDYTLAIAVKKQF----(56)----AREFFKHFAEEHA-AHTENAWRDRFRKFLLAYG----
hRap1	(132)	-GRIAFDADDDVAILTYYKENA----(8)----NALWKAMEKSSLT-QHSWQSLKDRYLKHLRG----
spRap1	(132)	-KRELFTLEDEKILIDHVKND----(5)----TKVYEELARKYP--QHSLESWRQHYKYMKKR----
c-Myb R1	(38)	LGKTRWTRREEDEKLLKLVQNG-----TDDWKVIANIYLP--NRTDVQCQHRWQKVLNP----
c-Myb R2	(90)	LIKGPWTKEEDQRVIELVQKYG-----PKRWSVIAKHLK--GRIGKQCRERWHNHLNP----
c-Myb R3	(142)	VKKTSWTEEEEDRIIYQAHKRLG-----NRWAEIAKLLP--GRTDNAIKNHNWNSTMRR----

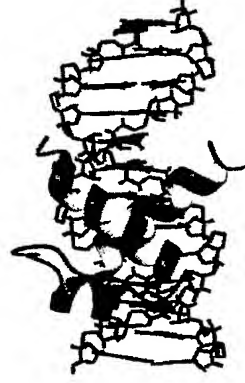
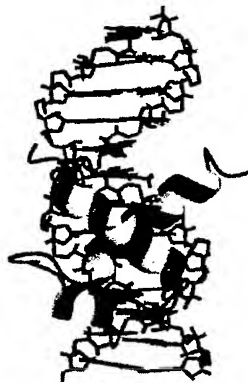
【図 2 (a)】



【図 2 (b)】

hTRF2complex

(a)

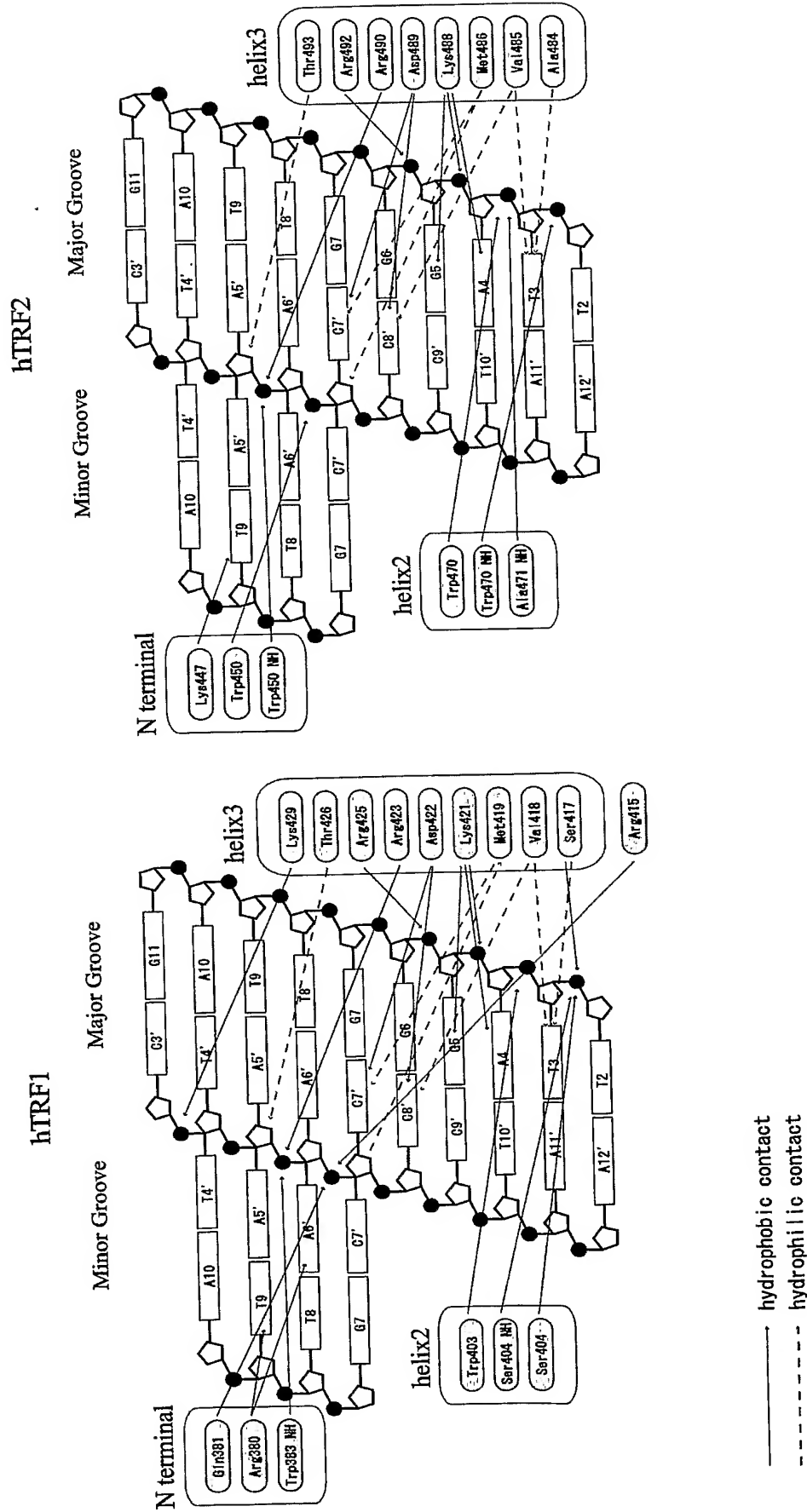


(b)



【図 3 (a)】

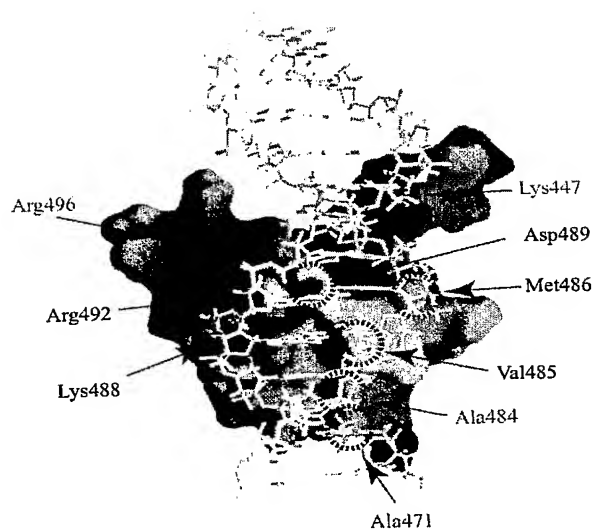
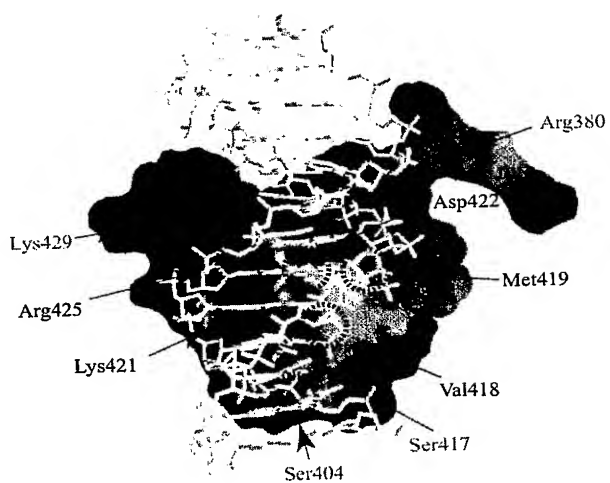
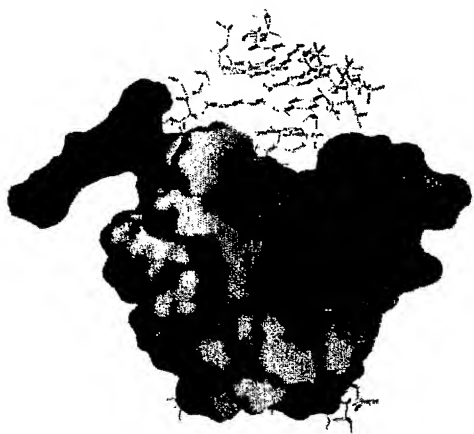
Summary of the inter-molecular contacts observed in the ensemble of NMR structure.



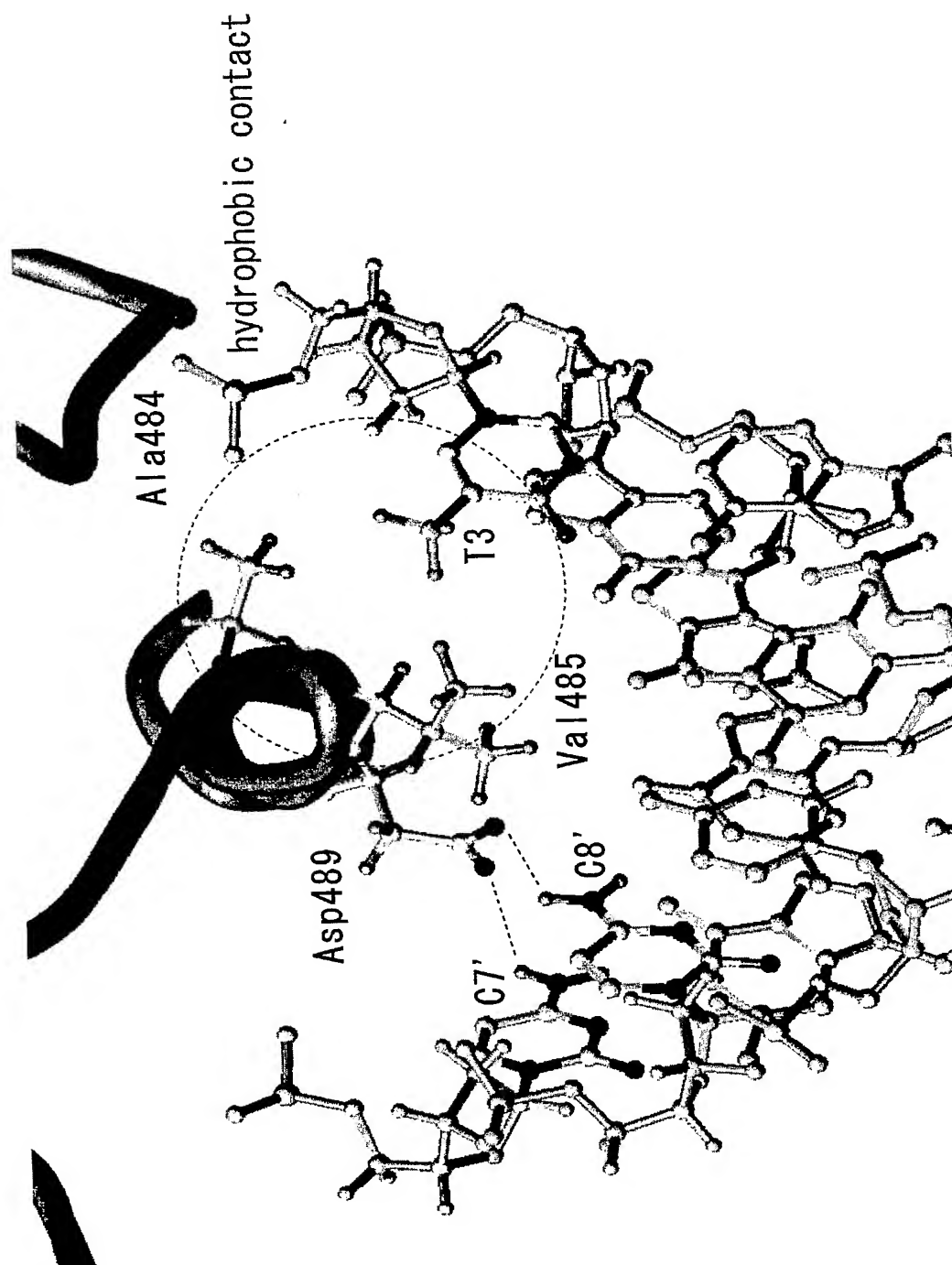
【図 3 (b)】

hTRF1complex

hTRF2complex

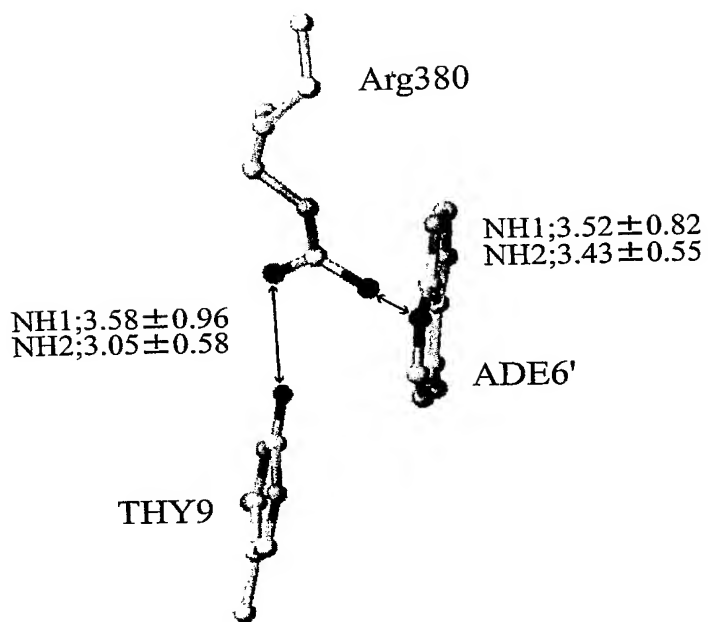


【図 4】

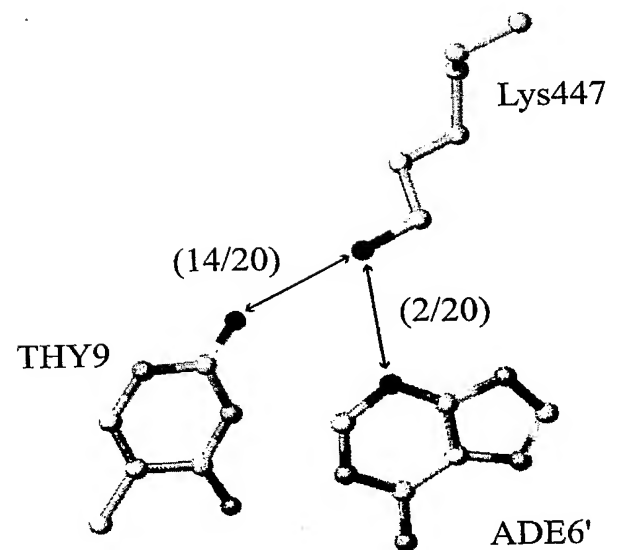
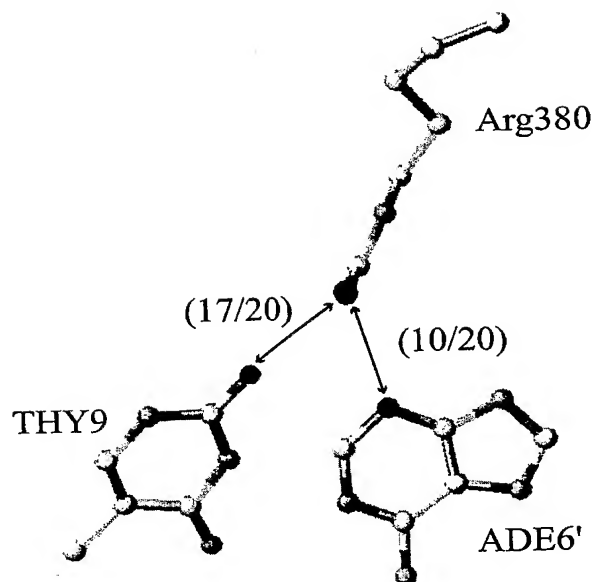
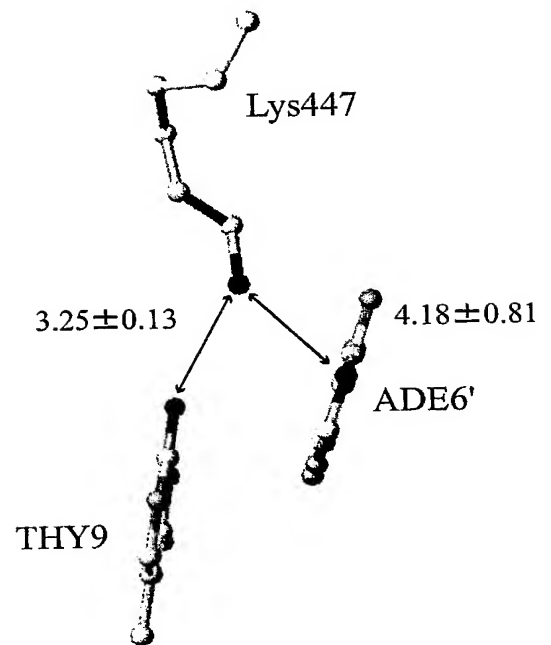


【図 5 (a)】

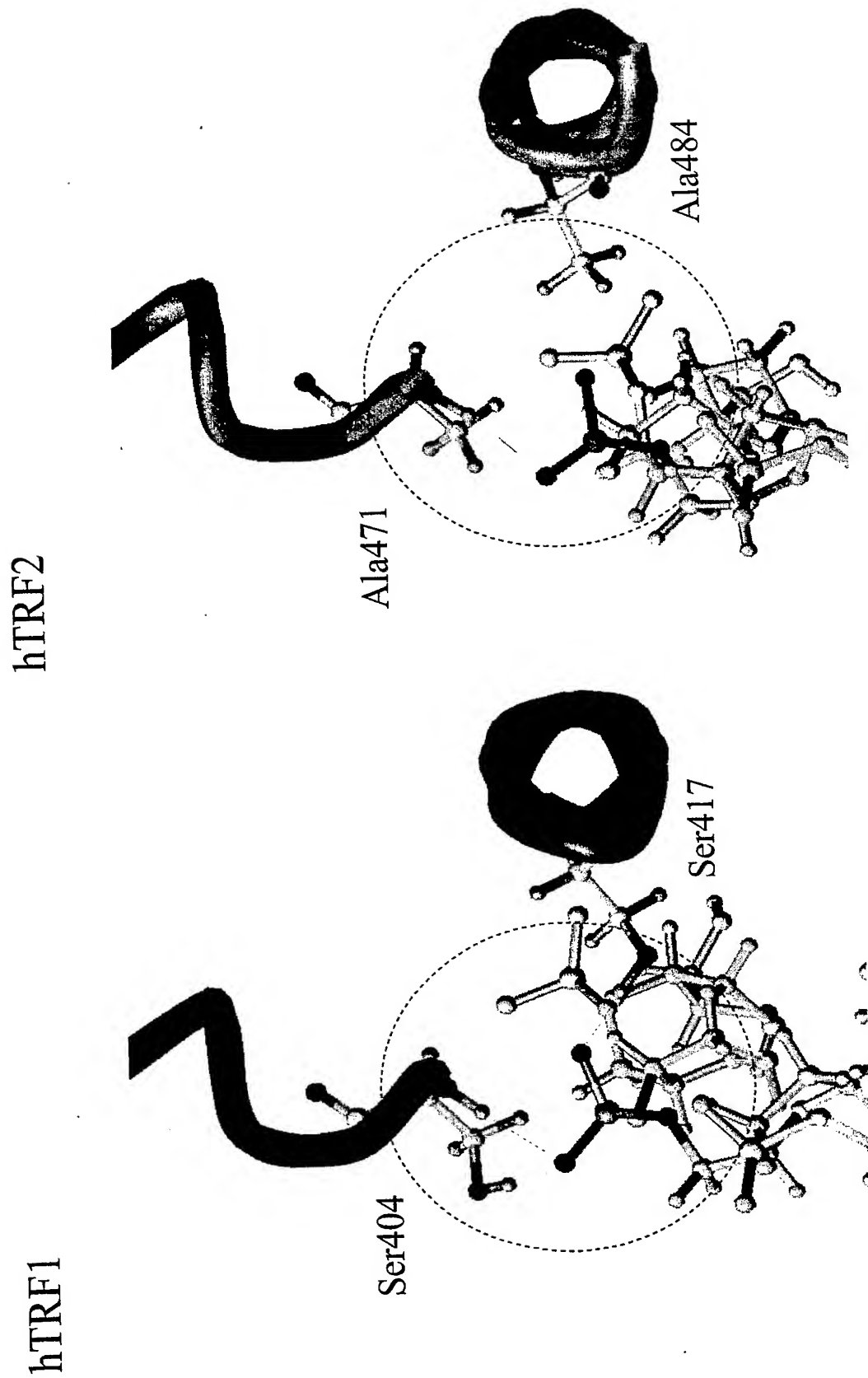
hTRF1



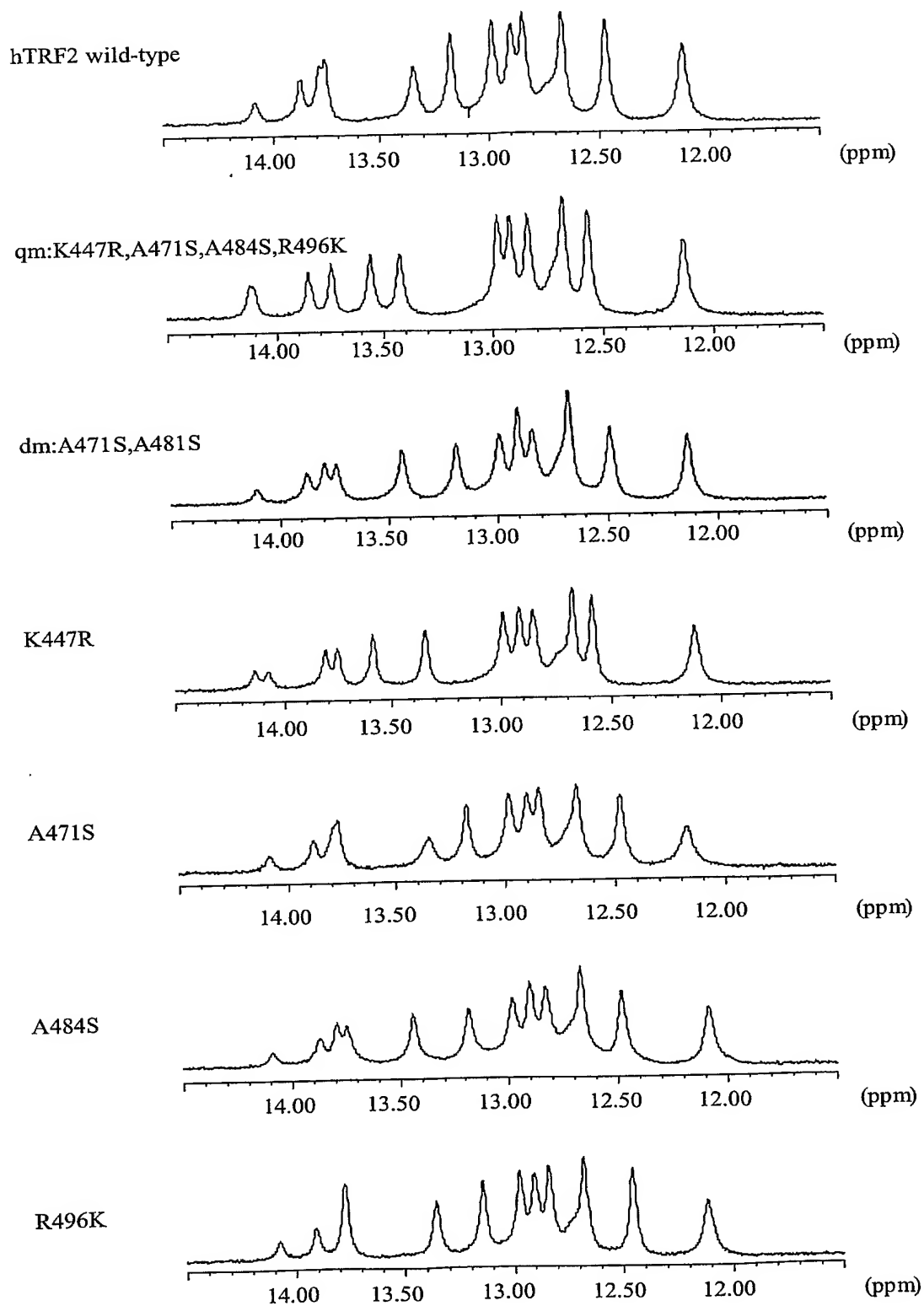
hTRF2



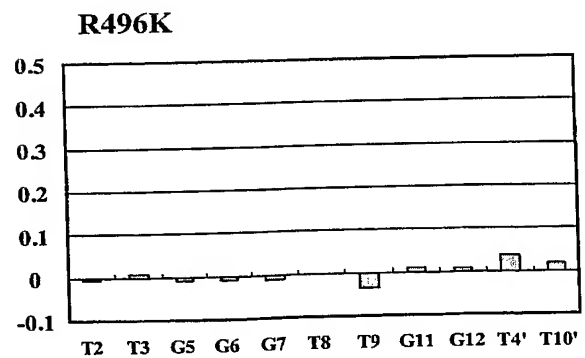
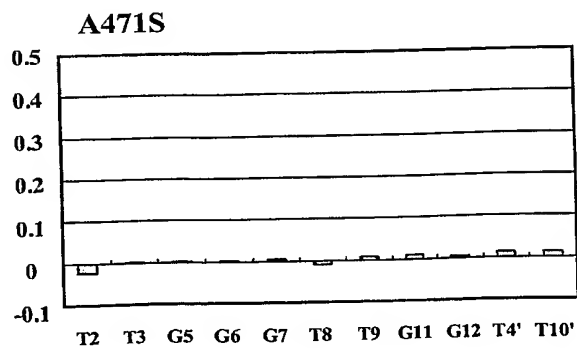
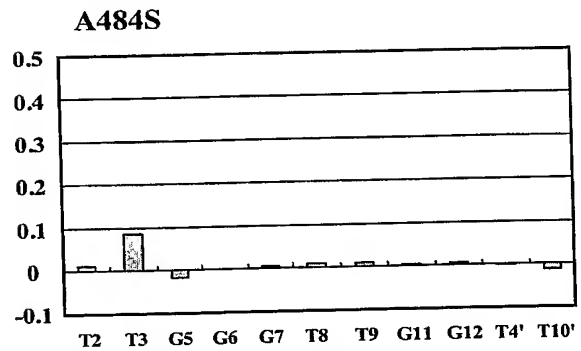
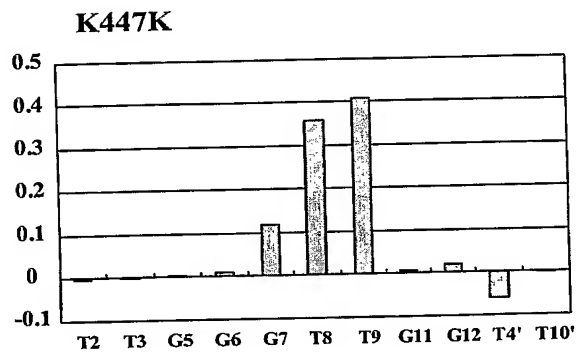
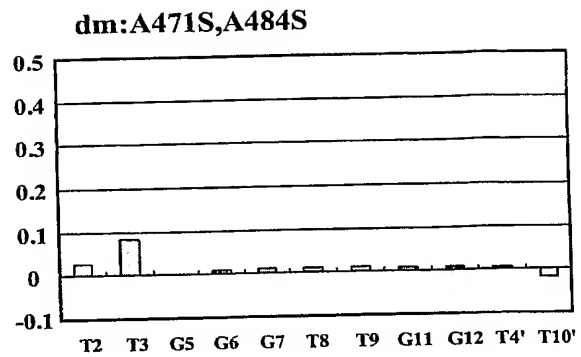
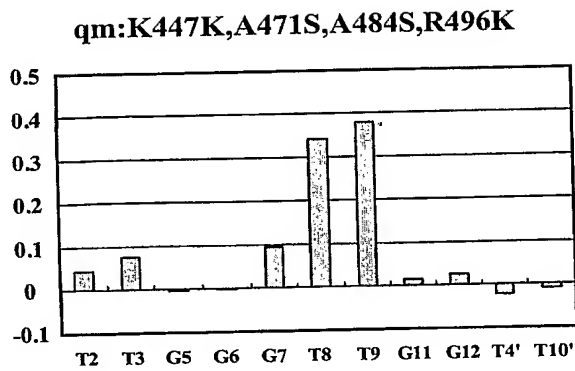
【図 5 (b)】



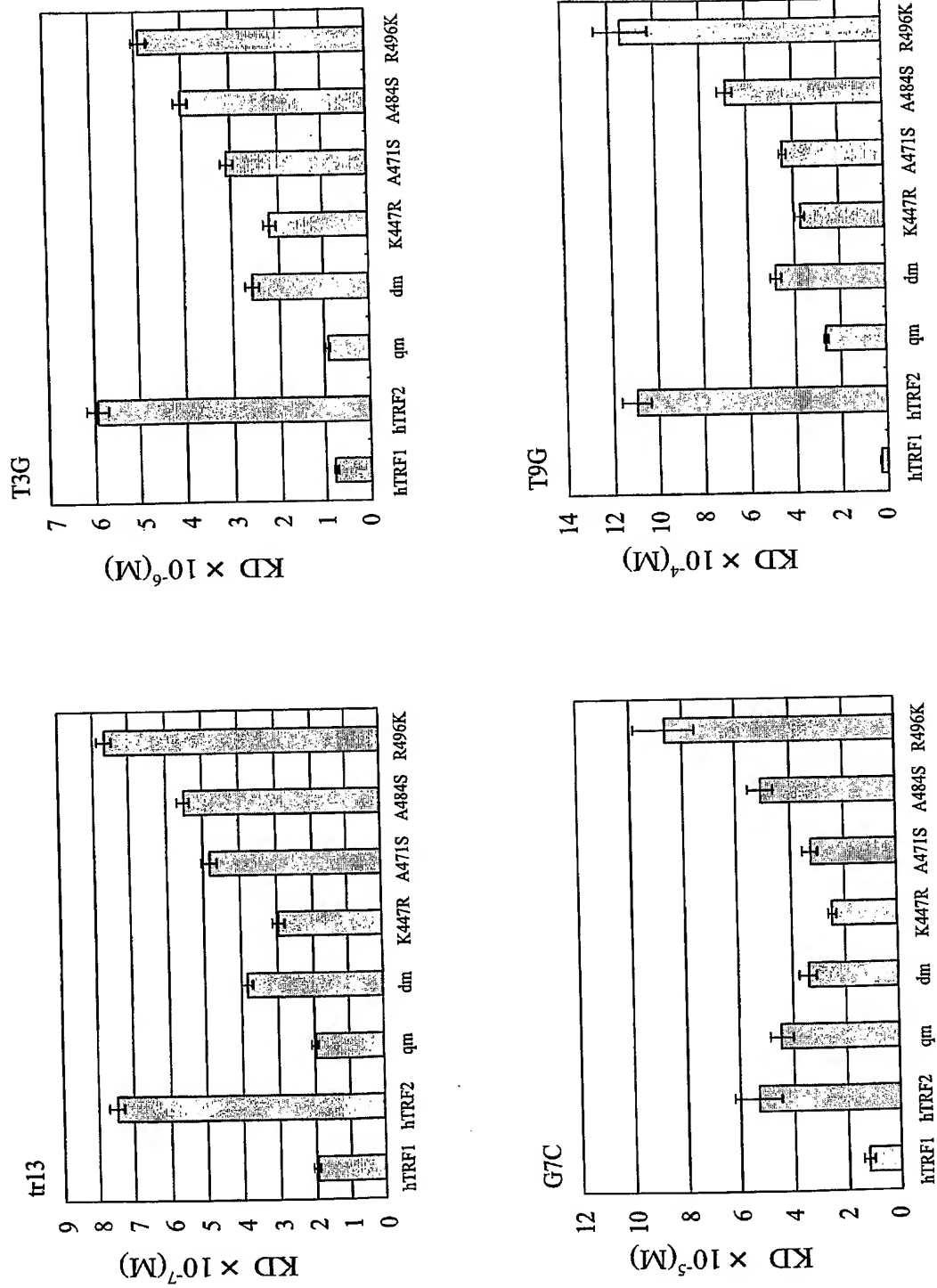
【図 6 (a)】



【図 6 (b)】



【図7】



【図 8】

Engrailed HD	-----LNEAQIKIWFQNKRAKIKKS
Paired HD	-----LTEARIQVWFQNRRLRKQHTSVS
Eve HD	-----LPESTIKIWFQNRPMKDKRQR
Antp HD	-----LTERQIKIWFQNRPMKKNKTKGEPG
Pit-1	-----LEKEVVRVWFQNRQRQKRVK
MSX-1	-----LTETQVKIWFQNRRAKAKRL
HOX-B1	-----LNETQVKIWFQNRMMQKKRERE
pbx-1	-----ITVSQVSNWFGNKRIRYKKNIGKQFEANIYAA
OCT-1	-----MEKEVIRVWFQNRQKQKRIKP
OCT-2	-----MEKEVIRVWFQNRQKQKRIKP
OCT-4	-----LEKQVVRVWFQNRQKQKGRSS
MATA1	-----ITPLQVRVWFQNKRMRSK
MAT α 2	-----LSRIQIKNWVSNNRREKTTITIAPELADLLSEP
Fushi Tarazu	-----LSEQIKIWFQNRMMKSKORTLDSSPEH
VND-Nk2	-----LTPTQVKIWFQNRHRYKTKRAQNEKGYEGHP
LFBI/HFN1 factor	-----KNPSKEERETLVEECNRAECIORGVSPSQAGLGSNLTVEVRVYNFANRRKEAFRHKLAMDTYKILN
Thyroid transcription factor 1	-----LTPTQVKIWFQNRHRYKMKRQAKDKAAQQ
Ins	-----LSPRVIRVWFQNKRCCKKRSIMMK

helix3

helix2

helix1

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 テロメアタンパク質 TRF2 DNA 結合ドメインとテロメア二重らせん DNA との複合体構造とその機能を解析すること。また、これらの解析結果により、TRF2 の DNA への結合能を調節できる薬剤のスクリーニングを可能とし、TRF2 をターゲットにした創薬に貢献すること。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)の TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩。

(a)野生型 hTRF2 の DNA 結合ドメインのアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換、34位のアラニンからセリンへの置換、47位のアラニンからセリンへの置換及び59位のアルギニンからリシンへの置換からなる群より選択される少なくとも1つの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(b)(a)のタンパク質のアミノ酸配列において、10位のアミノ酸、34位のアミノ酸、47位のアミノ酸及び59位のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ5'-TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせん DNA への結合能が配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型 TRF2 DNA 結合ドメインよりも高いタンパク質

【選択図】 図3 (b)

特願 2004-046238

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

- | | |
|----------|-----------------|
| 1. 変更年月日 | 2003年10月 1日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 |
| 氏 名 | 独立行政法人 科学技術振興機構 |
| | |
| 2. 変更年月日 | 2004年 4月 1日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 |
| 氏 名 | 独立行政法人科学技術振興機構 |

特願 2 0 0 4 - 0 4 6 2 3 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 8 0 4 7 2 2 7]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所
氏 名

1 9 9 8 年 6 月 2 4 日

新規登録

神奈川県横浜市中区港町 1 丁目 1 番地

横浜市